

LINETE PAROLIN ERCOLE

ANÁLISE DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NA ESCLEROSE  
SISTÊMICA

Tese apresentada ao Curso de Doutorado  
em Medicina Interna do Departamento de  
Clínica Médica do Setor de Ciências da  
Saúde da Universidade Federal do  
Paraná, como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Dr. Acir Rachid

Co-Orientador: Dra. Mariester Malvezzi

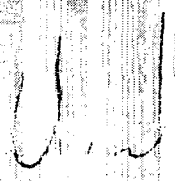
CURITIBA  
2001


# PARECER


PARECER CONJUNTO dos Professores Dr. Alexandre Gabriel Júnior, Dr. João Carlos Domingues Repka, Dra. Iara Taborda de Messias-Reason, Dr. José Zanis Neto e Dr. Acir Rachid sobre a Tese de Doutorado em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, elaborada por Linete Parolin Ercole, intitulada: "ANÁLISE DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NA ESCLEROSE SISTÊMICA",

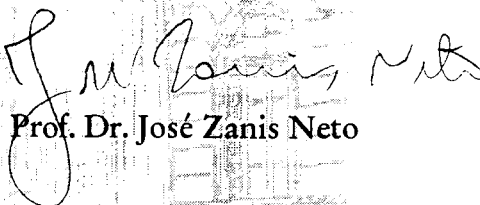
A Banca Examinadora considerou que Linete Parolin Ercole apresentou trabalho adequado para Tese de Doutorado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe: Conceito "A", correspondente ao Grau "10", sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de DOUTORA EM MEDICINA e a publicação da Tese em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

Curitiba, 25 de maio de 2001.

  
Prof. Dr. Alexandre Gabriel Júnior

  
Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka

  
Profa. Dra. Iara José Taborda de Messias-Reason

  
Prof. Dr. José Zanis Neto

  
Prof. Dr. Acir Rachid

*Aos meus pais, Lino e Elzi; e meu esposo  
Elia, pelo amor, estímulo e carinho  
recebidos.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Acir Rachid, orientador deste trabalho, pela amizade e apoio recebidos;

À Profa. Dra. Mariester Malvezzi, pela sua dedicação, amizade e estímulo sempre presentes;

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Boaretti, pelo seu incentivo, amizade e apoio na realização deste trabalho;

À Profa. Dra. Shirley Rosa Utiyama, pelas suas valiosas sugestões e seu estímulo;

Ao Dr. Renato Nisihara, pelo auxílio na realização dos procedimentos de laboratório;

Ao Prof. Dr. Rogerio Andrade Mulinari, Coordenador do Doutorado em Medicina Interna, pelo apoio e orientação recebidos;

À Bel. Márcia Olandoski Erbano, pelo valioso auxílio na análise dos resultados estatísticos;

Aos funcionários do Laboratório de Imunofenotipagem do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio recebido;

Aos funcionários do Laboratório de Imunopatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela amizade e auxílio recebidos;

À Profa. Millores Aparecida Getikoski, pela amizade e disposição no trabalho de editoração desta pesquisa;

Às secretárias Lucia Lemiszka e Valéria Knapp, do Curso de Pós Graduação em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná pela amizade e cooperação recebidas;

Às enfermeiras do Pronto Atendimento do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela cooperação e carinho recebidos;

Aos pacientes e controles sadios, pela colaboração, permitindo a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELA .....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	vii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>4</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>6</b>
3.1 ESCLEROSE SISTÊMICA.....	7
3.1.1 Epidemiologia .....	7
3.1.2 Etiopatogênese .....	8
3.1.2.1 Fatores genéticos .....	8
3.1.2.2 Fatores ambientais.....	9
3.1.2.3 Fatores imunológicos .....	10
3.1.3 Manifestações clínicas .....	12
3.1.4 Alterações laboratoriais.....	15
3.1.5 Diagnóstico e classificação .....	17
3.1.6 Tratamento.....	18
3.1.7 Prognóstico .....	19
3.2 POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS .....	19
3.3 POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NA ESCLEROSE SISTÊMICA .....	24
<b>4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
4.1 PACIENTES.....	31
4.2 GRUPO CONTROLE.....	34
4.3 MÉTODOS.....	34
4.3.1 Auto-anticorpos.....	34
4.3.1.1 Anticorpo antinuclear e anticorpo anticentrômero.....	34
4.3.1.2 Anticorpo anti-Scl-70.....	34
4.3.1.3 Anticorpos anti- RNP, anti-Sm, anti-Ro e anti-La.....	35
4.3.2 Capilaroscopia periungueal.....	35
4.3.3 Identificação das subpopulações linfocitárias .....	35
4.3.3.1 Anticorpos monoclonais .....	36
4.3.3.2 Caracterização imunofenotípica.....	37
4.3.3.3 Citometria de fluxo .....	39
4.3.4 Análise estatística .....	40
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
5.1 DADOS CLÍNICOS .....	42
5.2 AUTO-ANTICORPOS .....	43
5.2.1 Anticorpo antinuclear .....	43
5.2.2 Anticorpo anti-Scl-70.....	43
5.2.3 Anticorpo anticentrômero .....	43
5.2.4 Anticorpo anti-Ro .....	43
5.2.5 Anticorpo anti-RNP .....	44
5.2.6 Anticorpo anti-La e anti-Sm.....	44
5.3 CAPILAROSCOPIA PERIUNGUEAL.....	44
5.4 SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS .....	44

5.4.1 Comparação entre as subpopulações linfocitárias do grupo de pacientes com ES e do grupo controle .....	44
5.4.2 Correlação entre as subpopulações linfocitárias e as formas clínicas da ES.....	45
5.4.3 Correlação entre as subpopulações linfocitárias e a duração da ES.....	48
5.4.4 Correlação entre as subpopulações linfocitárias e a presença de anticorpo anti-Scl-70.....	51
5.4.5 Correlação entre as subpopulações linfocitárias e a presença de anticorpo anticentrômero .....	52
5.4.6 Correlação entre as subpopulações linfocitárias e as manifestações clínicas da ES.....	53
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
6.1 DADOS DEMOGRÁFICOS.....	55
6.2 DADOS CLÍNICOS .....	56
6.3 AUTO-ANTICORPOS .....	58
6.4 CAPILAROSCOPIA PERIUNGUEAL.....	59
6.5 SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS .....	60
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>87</b>

## LISTA DE TABELAS

1	ANTICORPOS MONOCLONAIS E AS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS CORRESPONDENTES.....	36
2	SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS DO GRUPO DE PACIENTES E DO GRUPO CONTROLE.....	45
3	SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NA FORMA DIFUSA DA ES E NO GRUPO CONTROLE .....	46
4	SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NA FORMA LIMITADA DA ES E NO GRUPO CONTROLE .....	47
5	SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS E AS FORMAS CLÍNICAS DA ES .....	48
6	SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NOS PACIENTES COM ES RECENTE E NO GRUPO CONTROLE .....	49
7	SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NOS PACIENTES COM ES TARDIA E NO GRUPO CONTROLE .....	50
8	SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS E A DURAÇÃO DA ES .....	51
9	SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS E A PRESENÇA DE ANTICORPO ANTI-Scl-70 .....	52
10	SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS E A PRESENÇA DE ANTICORPO ANTICENTRÔMERO .....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACA	- ANTICORPO ANTICENTRÔMERO
ANA	- ANTICORPO ANTINUCLEAR
Anti-La	- ANTICORPO CONTRA A PROTEÍNA NUCLEAR La
Anti-RNP	- ANTICORPO CONTRA RIBONUCLEOPROTEÍNA
Anti-Ro	- ANTICORPO CONTRA PROTEÍNA NUCLEAR Ro
Anti-Sm	- ANTICORPO CONTRA A PROTEÍNA NUCLEAR Sm
Anti-Scl-70	- ANTICORPO ANTI-TOPOISOMERASE I
CALLA	- ANTÍGENO COMUM DA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA
CD	- "CLUSTER OF DIFFERENTIATION"
CDC	- "CENTER FOR DISEASE CONTROL"
CPH	- COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE
CPU	- CAPILAROSCOPIA PERIUNGUEAL
CREST	- CALCINOSE, FENÔMENO DE RAYNAUD, DISMOTILIDADE ESOFAGEANA, ESCLERODACTILIA E TELANGIECTASIAS
DMTC	- DOENÇA MISTA DO TECIDO CONJUNTIVO
DNA	- ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
DPR	- DOENÇA PULMONAR RESTRITIVA
EDTA	- ÁCIDO ETILENO DIAMINO TETRA ACÉTICO
ENA	- ANTÍGENO NUCLEAR EXTRAÍVEL
ES	- ESCLEROSE SISTÊMICA
FITC	- ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA
FR	- FENÔMENO DE RAYNAUD
HLA	- ANTÍGENO DE HISTOCOMPATIBILIDADE LEUCOCITÁRIA
HLA-DR	- RECEPTOR DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE CLASSE II
HP	- HIPERTENSÃO PULMONAR
ICAM	- MOLÉCULA DE ADESÃO INTRACELULAR
Ig	- IMUNOGLOBULINA
IL	- INTERLEUCINA
LAK	- "LYMPHOKINE ACTIVATED KILLER"



NK	- “NATURAL KILLER”
PBS	- TAMPÃO FOSFATO SALINO
PCR	- PROTEÍNA-C-REATIVA
PDGF	- FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DAS PLAQUETAS
PE	- FICOERITRINA
PECy5	- FICOERITRINA/CIANINA5
PerCP	- PERIDININA CLOROFILADA
PM-Scl	- POLIMIOSITE-ESCLERODERMIA
RNA	- ÁCIDO RIBONUCLEICO
RNP	- RIBONUCLEOPROTEÍNA
SD	- ESCLERODÉRMICO
TC	- TERCEIRA COR
TCR	- RECEPTOR DE CÉLULA T
TdT	- DEOXINUCLEOTIDILTRANSFERASE TERMINAL
TGF- $\beta$	- FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR - $\beta$
TNF- $\alpha$	-FATOR DE NECROSE TUMORAL- $\alpha$
UFPR	- UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
VCAM	- MOLÉCULA DE ADESÃO DE CÉLULAS VASCULARES
VHS	- VELOCIDADE DE HEMOSSEDIMENTAÇÃO
VLA	- “VERY LATE ANTIGEN”

## RESUMO

A Esclerose Sistêmica (ES) é uma doença inflamatória crônica do tecido conjuntivo, de etiologia desconhecida, caracterizada por fibrose e dano microvascular dos órgãos afetados. Há várias evidências de que a ativação do sistema imune celular participa de maneira expressiva na sua patogênese. O objetivo deste estudo foi analisar numericamente as subpopulações linfocitárias de pacientes com ES e sua possível correlação com fatores clínicos e laboratoriais. Foi estudado um grupo de 42 pacientes que preencheram os critérios de diagnóstico do Colégio Americano de Reumatologia para ES e um grupo de 28 controles normais. Os pacientes foram selecionados no ambulatório de Reumatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, no período de outubro de 1997 a setembro de 1999. Foram realizadas avaliação clínica, capilaroscopia periungueal e pesquisa dos seguintes parâmetros imunes: anticorpo antinuclear, anti-Scl-70, anticentrômero, anti-RNP, anti-Ro, anti-La, anti-Sm e antígenos linfocitários CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD45RA, CD56, CD71, HLA-DR, TCR $\alpha/\beta$  e TCR $\gamma/\delta$ . Ambos os grupos tiveram suas subpopulações linfocitárias avaliadas através da citometria de fluxo. Dos 42 pacientes, 38 (90,5%) eram do sexo feminino e 4 (9,5%) do sexo masculino. A idade por ocasião do início da doença variou de 11 a 54 anos, com média de 37,5 anos e o tempo de duração da doença variou de 1 a 30 anos, com média de 6,1 anos. Nos pacientes com ES comparados ao grupo controle foram encontrados valores percentuais normais para os linfócitos T CD2+, CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD25+, CD4+CD45RA+, CD8+CD45RA+, CD71+ e para a relação CD4+/CD8+. Em contraste, os linfócitos T CD3+TCR $\gamma/\delta$ + mostraram-se com percentuais diminuídos nos pacientes com ES difusa, de longa duração, com envolvimento pulmonar caracterizado por doença pulmonar restritiva, envolvimento muscular e presença de anticorpo anti-Scl-70. Os pacientes com a forma difusa da ES apresentaram tanto na fase recente como na tardia aumento na percentagem de linfócitos T CD4+ e CD8+ expressando moléculas de ativação HLA-DR. Na fase tardia da doença, não importando a forma clínica, foi encontrado aumento na percentagem de linfócitos T CD4+CD45RA+. Os pacientes com ES limitada e fase recente mostraram diminuição na percentagem de linfócitos B CD19+. Os pacientes com doença difusa e fase tardia apresentaram diminuição na percentagem dos linfócitos NK CD56+. Estes resultados sugerem que as alterações dos linfócitos T, B e NK possam estar envolvidas no processo de desencadeamento e/ou perpetuação da ES, podendo talvez, em alguns subgrupos particulares de pacientes, ter utilidade prognóstica.

## ABSTRACT

Systemic sclerosis (SSc) is a chronic inflammatory connective tissue disease, of unknown etiology, characterized by fibrosis and microvascular injury in affected organs. It has become clear that activated cellular immune system plays a central role in the pathogenesis of SSc. The purpose of this study was to analyze the lymphocyte sub-populations numbers and their correlations with clinical and laboratory manifestations. We studied a group of 42 patients who fulfilled the American College Rheumatism criteria for SSc and a group of 28 matched normal controls. The patients were followed at Rheumatology Unit of Hospital de Clínicas – Federal University of Paraná – Brazil, from October 1997 to September 1999. Clinical involvement, nailfold capillaroscopy and immunologic parameters: antinuclear antibodies, anti-Scl-70 antibodies, anticentromeric antibodies, anti-RNP antibodies, anti-Ro antibodies, anti-La antibodies, anti-Sm antibodies and lymphocyte cell-surface markers CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD45RA, CD56, CD71, HLA-DR, TCR $\alpha/\beta$  and TCR $\gamma/\delta$  were analyzed. Both groups had lymphocyte sub-populations evaluated by flow cytometry. Among the 42 patients 38 (90,5%) were female, and 4 (9,5%) male, the age of disease onset ranged from 11 to 54 years (mean: 37,5 years) and the disease duration ranged from 1 to 30 years (mean: 6,1 years). Patients with SSc had similar percentages of CD2+, CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD25+, CD4+CD45RA+, CD8+CD45RA+, CD71+ cells and CD4+/CD8+ cells ratio when compared to normal controls. In contrast, the TCR $\gamma/\delta$  cells had significantly smaller percentages in SSc patients with diffuse and late-stage disease with pulmonary involvement (interstitial pulmonary changes), muscle involvement and anti-Scl-70 antibodies presence. Patients with early and late-stage disease and diffuse SSc had significantly increased percentages of HLA-DR in CD4+ and CD8+ T cells. Patients with late-stage disease had increased percentages of CD4+CD45RA+ T cells. Patients with limited and early-stage disease had smaller percentages of B cells (CD19+). Patients with diffuse and late-stage disease had smaller percentages of NK cells (CD56+). These results suggest that T, B and NK cells alterations may be involved at the onset and/or perpetuation of the disease processes and may eventually be useful as a prognostic indicator in selected patient subgroups.

## 1 INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

Os linfócitos e seus antígenos de superfície têm sido alvo de muitas investigações na tentativa de esclarecer o seu papel no complexo mecanismo patogênico das doenças autoimunes como a Esclerose Sistêmica (ES).

As doenças autoimunes podem resultar de anormalidades primárias dos linfócitos T, linfócitos B ou ambos. Mesmo em doenças mediadas por auto-anticorpos, o defeito pode situar-se nos linfócitos T auxiliares, que são necessários para a produção de anticorpos de alta afinidade. Como os linfócitos T auxiliares desempenham um papel capital na regulação de todas as respostas imunes e sabendo-se que a deleção clonal dos linfócitos T é um modo efetivo de manutenção da autotolerância, grande parte das pesquisas recentes têm sido centradas no papel dos linfócitos T na auto-imunidade (KAHALEH, 1990).

A ES é uma doença inflamatória crônica do tecido conjuntivo, de etiologia desconhecida, caracterizada por fibrose e dano microvascular dos órgãos afetados, apresentando diversas manifestações clínicas e laboratoriais com curso e prognóstico variáveis. Ainda que a etiologia e a patogênese da ES permaneçam obscuras, existem muitas evidências que a ativação dos sistemas imunes celular e humoral, que é evento precoce nessa doença, participe de maneira muito intensa nestes processos. Com a ativação do sistema imune celular, os linfócitos e seus produtos solúveis, incluindo as citocinas e os auto-anticorpos, podem ativar ou destruir as células endoteliais, os fibroblastos e a síntese de colágeno. Desta maneira o sistema imune pode causar dano tecidual nos pacientes com ES (SILVER, 1991; BLACK, 1995; WHITE, 1995; FURST & CLEMENTS, 1997).

Estudos demonstram que os linfócitos T ativados na fase inicial da doença migram infiltrando a pele e os órgãos internos. O predomínio de subpopulações distintas de linfócitos T na pele (CD4+) e no pulmão (CD8+) de pacientes com ES sugere que diferentes linfócitos T podem contribuir com o processo de doença em diferentes órgãos (GUDBJÖRNSSON et al., 1994; WHITE, 1996; FURST & CLEMENTS, 1997).

Outra evidência da ativação imune na ES são os achados de mediadores solúveis (citocinas) em grandes quantidades incluindo a interleucina-2, a interleucina-

4, a interleucina-6 e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Todos estes mediadores podem ser produzidos pelos linfócitos T ou outras células inflamatórias (WHITE, 1995; WHITE, 1996; FURST & CLEMENTS, 1997).

Os linfócitos B também são ativados precocemente, levando a hipergamaglobulinemia e a produção de auto-anticorpos, como o anti-topoisomerase I (anti-Scl-70), o anticentrômero e o anti-RNA polimerase I e III, que são encontrados com frequência e considerados relativamente específicos para a ES (WHITE, 1995; WHITE, 1996; FURST & CLEMENTS, 1997).

O estudo das populações de linfócitos no sangue de pacientes com ES tem apresentado resultados conflitantes devido aos diferentes métodos empregados e aos diferentes critérios de seleção dos pacientes. Com a disponibilidade dos anticorpos monoclonais e da citometria de fluxo tornou-se possível a determinação do fenótipo das células de acordo com as suas populações funcionalmente distintas (GUSTAFSSON et al., 1990; BRUNS et al., 1994; WHITE, 1996).

No presente estudo, foram analisadas as subpopulações linfocitárias no sangue periférico de pacientes com ES, nas formas clínicas limitada e difusa, juntamente com sua correlação com o tempo de doença, as manifestações clínicas e a presença de auto-anticorpos, sendo este um trabalho inédito na população brasileira.

## **2 OBJETIVOS**

## 2 OBJETIVOS

O presente estudo tem os seguintes objetivos:

- 1- Analisar o perfil das subpopulações linfocitárias (linfócitos T, B e NK) nos pacientes com ES.
- 2- Verificar a correlação entre as subpopulações linfocitárias e as formas clínicas limitada e difusa da ES.
- 3- Observar o comportamento das subpopulações linfocitárias de acordo com o tempo de duração da ES.
- 4- Correlacionar as manifestações clínicas da ES e as subpopulações linfocitárias.
- 5- Analisar as subpopulações linfocitárias com relação à presença dos anticorpos anti-Scl-70 e anticentrômero.



### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 ESCLEROSE SISTÊMICA**

A ES é uma doença inflamatória crônica generalizada do tecido conjuntivo, de etiologia desconhecida, que afeta múltiplos órgãos, caracterizada pela presença de fibrose e lesão da microvasculatura da pele e dos órgãos internos, levando à alteração funcional e falência dos mesmos (SEIBOLD, 1994).

##### **3.1.1 Epidemiologia**

A ES é uma doença de ocorrência mundial, sendo sua incidência bastante variável nos trabalhos descritos na literatura. Estes dados variam de 0,6 por milhão a 19,1 por milhão (STEEN & MEDSGER Jr., 1990; STEEN, 1990; SILMAN, 1991; SEIBOLD, 1994; MAYES, 1996; MITCHELL et al., 1997; SILMAN, 1997; MAYES, 1997).

Os estudos sobre a prevalência da ES também têm sido difíceis pelas diferenças próprias de cada população, variando a mesma de 4 por milhão até 290 por milhão (SAMPAIO-BARROS, 1993; POPE & BELLAMY, 1993; SEIBOLD, 1994; MITCHELL et al., 1997).

As mulheres são afetadas pela ES com maior frequência que os homens em uma proporção que varia de 3-8:1 (SILMAN, 1991; POPE & BELLAMY, 1993; MITCHELL et al., 1997), podendo chegar a 15:1 durante o período fértil da mulher e cair para 2:1 após os 50 anos (STEEN & MEDSGER Jr., 1990).

O pico de incidência da ES com relação à idade está entre a quarta e a quinta décadas (POPE & BELLAMY, 1993), com uma variação de início dos sintomas entre 5 e 86 anos (MITCHELL et al., 1997). A ocorrência de ES em crianças é infreqüente (CASSIDY & PETTY, 1995; SILMAN, 1997). Nas mulheres negras existe um pico de incidência da doença mais precoce do que nas mulheres brancas, ocorrendo no grupo jovem e de meia idade (SEIBOLD, 1994; MAYES, 1996; SILMAN, 1997). Nos homens é raro o acometimento antes dos 30 anos (STEEN & MEDSGER Jr., 1990; SAMPAIO-BARROS, 1993).

A ES na sua forma difusa parece ocorrer mais freqüentemente na população negra que na branca. Com relação à idade de início da doença, tem sido observado início mais precoce na forma difusa do que na forma limitada (MAYES, 1996).

### **3.1.2 Etiopatogênese**

Embora ainda pouco conhecida, a etiopatogênese da ES tem se demonstrado complexa e com a participação de múltiplos fatores no desenvolvimento das alterações que levam à doença. Fatores genéticos, ambientais e imunológicos atuam sobre o endotélio, ao nível da microcirculação e da proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno, levando à fibrose dos diferentes tecidos.

#### **3.1.2.1 Fatores genéticos**

A ocorrência de associação familiar é extremamente rara na ES, embora seja mais observada em pacientes com história familiar de doença autoimune como Artrite Reumatóide, Lupus Eritematoso Sistêmico e Tireoidites. Existem poucos relatos de famílias com mais de um membro apresentando ES (STEEN & MEDSGER Jr., 1990; SAMPAIO-BARROS, 1993; MANOLIOS et al., 1995; MITCHELL et al., 1997). A ES foi descrita em gêmeos idênticos (MAYES, 1997; MITCHELL et al., 1997). Tem sido identificado uma maior freqüência de auto-anticorpos em parentes consangüíneos aparentemente saudáveis dos pacientes com ES (BARNETT & McNEILAGE, 1993; SAMPAIO-BARROS, 1993; MAYES, 1997; MITCHELL et al., 1997).

Muitos estudos têm procurado estabelecer uma relação entre a ES e os antígenos de histocompatibilidade (HLA), porém esta associação ainda permanece bastante controversa. Os estudos iniciais com os HLA de classe I associaram HLA-B8 com doença visceral severa (STEEN, 1990). Trabalhos posteriores analisando os HLA de classe II sugeriram várias associações, como DR1 (BRIGGS & WELSH, 1991), DR3 (STEEN, 1990; BRIGGS & WELSH, 1991; SILVER, 1991) e DR5 (BRIGGS & WELSH, 1991; SILVER, 1991) em caucasóides e DR2 e DR4 em japoneses (STEEN, 1990; BRIGGS & WELSH, 1991; WHITE, 1994). O HLA-DR1 foi relacionado a ES forma limitada e com anticorpo anti-centrômero e o HLA-DR5 com a ES forma difusa e anticorpo anti-topoisomerase I (anti-Scl-70). Em estudos recentes o anticorpo anti-topoisomerase I tem sido associado com vários alelos HLA-DQB1, que compartilham

de uma tirosina comum na posição 30 de domínio de ligação. Em contraste, o anticorpo anti-centrômero tem sido associado com alelos HLA-DQB1 com uma glicina ou tirosina na posição 26. Tem sido sugerido que este resíduo particular tem um papel chave na determinação das propriedades de configuração do antígeno que ali pode se ligar (WHITE, 1994; MOREL et al., 1995; MAYES, 1996; SILMAN & NEWMAN, 1996).

Apesar de pouco estudado, os genes dos receptores de célula T podem estar distribuídos de forma diferente nos indivíduos com ES comparados com os indivíduos normais (BRIGGS et al., 1990; MAYES, 1996).

Com relação aos antígenos de histocompatibilidade classe III tem se observado a ocorrência de alelos nulos de C4a e C4b tanto na ES limitada como na difusa e em maior número do que na população geral (BRIGGS et al., 1990; MAYES, 1996). Em estudo do polimorfismo genético do Fator B do sistema de complemento em pacientes com ES, não foi observada associação alotípica (BOARETTI, 1998).

### **3.1.2.2 Fatores ambientais**

Vários agentes químicos devido a sua exposição ocupacional ou tóxica, têm sido implicados no desenvolvimento de casos de ES ou estados semelhantes a ela (STEEN, 1990; SILMAN & HOCHBERG, 1996; MITCHELL et al., 1997). Destacam-se entre estes agentes o pó de sílica nos trabalhadores de pedreiras, de minas de carvão e de ouro que evoluem para fibrose pulmonar e alterações cutâneas escleroderma-símile (SANCHEZ-ROMAN et al., 1993; INNOCENCIO et al., 1998).

Os solventes orgânicos, como os hidrocarbonetos aromáticos (tolueno, benzeno e xileno), os hidrocarbonetos alifáticos clorados (cloreto de polivinil, tricloroetileno e percloroetileno) e os não clorados (nafta-n-hexano) têm sido associados à esclerodermia ou a estados esclerodermóides (SILMAN & HOCHBERG, 1996; STEEN, 1999).

Outros compostos como as resinas sintéticas e epóxi, além de drogas como bleomicina, cisplatina, pentazocina, carbidopa, L-triptofano, cocaína, inibidores do apetite (mazindol, fenproporex, fenfluramine e dexanfetamina) estão também relacionados (SILMAN & HOCHBERG, 1996; SILMAN & NEWMAN, 1996; VARGA & KÄHÄRI, 1997).

Fibrose pulmonar e alterações vâsculo-cutâneas semelhantes às da ES foram descritas na síndrome do óleo tóxico que ocorreu na Espanha em 1981 (SAMPAIO-BARROS, 1993).

Mais recentemente, algumas pacientes que utilizaram prótese mamária ou facial de silicone desenvolveram alterações esclerodermóides de natureza ainda não bem definida (STEEN, 1990; SILMAN & HOCHBERG, 1996; SILMAN & NEWMAN, 1996; MITCHELL et al., 1997).

Alguns autores têm descrito ocorrência de ES após trauma físico ou emocional, podendo esta associação ser coincidental ou servir como fator de ativação de doença subclínica (LEE, 1996).

### **3.1.2.3 Fatores imunológicos**

A participação de fatores imunológicos está bem estabelecida na ES e é representada principalmente pela ativação da imunidade celular e da humoral (WHITE, 1995; FURST & CLEMENTS, 1997; SEIBOLD, 1997). Os linfócitos T circulantes são bastante ativos na ES, tornando-se reativos a componentes da membrana basal, como a laminina, ao colágeno tipo I e principalmente às células endoteliais (KAHALEH, 1990; CLEMENTS, 1995; POSTLETHWAITE, 1995; HEBBAR et al., 1997; SATO, 1999). Em indivíduos geneticamente predispostos, a atuação das integrinas ou VLA (Very Late Antigen) iniciaria o fenômeno da co-estimulação de linfócitos, a partir de sua ligação com elementos da matriz extracelular (colágeno tipo I e IV, laminina e fibronectina) (MAUCH & KRIEG, 1990; POSTLETHWAITE, 1990; POSTLETHWAITE, 1995; LeROY, 1996; FURST, 1997). Com a ativação das células do sistema imune ocorre a secreção de vários mediadores solúveis que podem alterar a função dos fibroblastos, das células endoteliais e da síntese de colágeno (CROMBRUGGHE et al., 1990; CROMBRUGGHE et al., 1991; UNEMORI & AMENTO, 1996).

Os mediadores solúveis que têm sido relatados como presentes em quantidades anormais no soro dos pacientes com ES incluem-se a interleucina-1 (IL-1), a IL-2, a IL-4, a IL-6, a IL-8, o TNF- $\alpha$ , o TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador- $\beta$ ), o PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas), a granzyme A e o leucotrieno B4 (KAHALEH, 1990; POSTLETHWAITE, 1990; KAHALEH, 1993; BLACK, 1995; CLEMENTS, 1995; WHITE, 1995; LeROY, 1996).

A IL-2 parece correlacionar-se com a progressão do espessamento cutâneo (BRIGGS & WELSH, 1991; POSTLETHWAITE, 1995). A IL-4 é considerada uma citocina fibrogênica por estimular a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno tipos I e III (FURST & CLEMENTS, 1997). As citocinas pró-inflamatórias, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e o PDGF, estimulam a proliferação de fibroblastos (LeROY, 1996; FURST & CLEMENTS, 1997). O TGF- $\beta$  aumenta a fibrose pela estimulação dos componentes da matriz extracelular (FURST & CLEMENTS, 1997).

Estes mediadores solúveis ocasionam lesão endotelial. A presença desta lesão é documentada pelo aumento dos níveis séricos de fator VIII de von Willebrand, de endotelina 1, de moléculas de HLA classe II e de moléculas de adesão, tais como, ICAM-1 (moléculas de adesão intracelular), VCAM-1 (moléculas de adesão de células vasculares) e integrina-B1. O aumento do nível das moléculas de adesão nas células de superfície resulta em dano endotelial permitindo aderência e saída dos linfócitos e outras células pró-inflamatórias através do endotélio para o tecido, onde interagem com fibroblastos e outras células (KAHALEH, 1990; BRIGGS & WELSH, 1991; KIENER et al., 1994; CLEMENTS, 1995; GIACOMELLI et al., 1998).

A ativação plaquetária, freqüentemente encontrada na presença de lesão endotelial, desempenha um papel precoce na progressão da doença, sendo demonstrada pelo aumento nos níveis de  $\beta$ -tromboglobulina, de fator plaquetário IV e de agregados plaquetários circulantes (KAHALEH, 1990; VEALE et al., 1995).

A presença de autoanticorpos contra moléculas intracelulares é um achado imunológico característico da ES. O anticorpo antinuclear (ANA) pode ser positivo em mais de 90% dos pacientes. Estes autoanticorpos têm sido considerados específicos para a ES, sendo seus alvos o DNA topoisomerase I, o centrômero cromossomal, o RNA polimerase I, II e III, e alguns componentes nucleolares. Têm sido estabelecido que alguns destes autoanticorpos estão ligados a subgrupos com manifestações clínicas características dentro do espectro da ES (CATOGGIO et al., 1983; POSTLETHWAITE, 1990; REIMER, 1990; SILVER, 1990; MÜHLEN & TAN, 1994; OKANO, 1996; ROSEN et al., 1997).

### 3.1.3 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas são múltiplas pelo amplo espectro com que a doença se apresenta, podendo iniciar de forma variada. Não existe um padrão clássico para os sinais e os sintomas.

O envolvimento da pele é a marca da ES. A presença de pele espessada e inelástica é o critério diagnóstico definitivo da ES (MASI et al., 1980). Este envolvimento cutâneo tem sido descrito em três fases: edematosa, indurativa e atrófica. A fase edematosa é caracterizada por edema difuso depressível em mãos e pés, com progressão centrípeta, ocorrendo intenso prurido. Na fase indurativa há reabsorção do edema e inicia-se o enrijecimento progressivo da pele. Na fase atrófica a pele está acentuadamente espessada, levando a retrações tendíneas, com contraturas em flexão nas mãos. Na face observamos microstomia, afilamento do nariz, perda dos sulcos perilabiais e ausência de rugas. Os anexos da pele vão sofrendo perdas progressivas (SILVER, 1991; MITCHELL et al., 1997). Para avaliação periódica da graduação do espessamento da pele nos pacientes com ES temos o escore cutâneo total (SAMPAIO-BARROS et al., 1997; SEIBOLD & McCLOSKEY, 1997).

O grau do espessamento da pele é um importante fator na distinção entre as formas limitada e difusa da ES. Na forma limitada, o espessamento da pele é limitado à extremidade distal dos cotovelos e joelhos, mas as regiões de face e pescoço podem estar envolvidas. Na forma difusa, o tronco e a região proximal das extremidades também estão envolvidas. Mais raramente, podemos observar a ES sem esclerodermia, ou seja, sem envolvimento cutâneo (MITCHELL et al., 1997).

Alterações de pigmentação, calcinose e telangiectasias são freqüentes, sendo as duas últimas alterações mais comuns na forma limitada da ES (MITCHELL, et al., 1997).

O Fenômeno de Raynaud (FR) é a manifestação vascular mais freqüente da ES, ocorrendo em 90 a 98% dos pacientes (BELCH, 1991), sendo a manifestação inicial em cerca de 70% dos pacientes. Podendo preceder o início da doença sistêmica por meses a anos (KALLENBERG, 1990; MITCHELL et al., 1997). Vários estudos demonstram que 24 a 50% dos pacientes que apresentam FR podem evoluir para uma doença de tecido conjuntivo (GERBRACHT et al., 1985; KALLENBERG, 1991). Existem alguns fatores que indicam potencial para este desenvolvimento como o início do FR

em paciente acima de 30 anos (SAMPAIO-BARROS, 1993); alterações da capilaroscopia periungueal (CPU) com a presença do padrão Esclerodérmico (padrão SD) caracterizado por alargamento das alças capilares e áreas avasculares localizadas ou difusas (CARPENTIER & MARICQ, 1990; BELCH, 1991; BORG et al., 1994; ERCOLE, 1994); presença de anticorpos antinucleares que predizem a presença de doença autoimune; e presença de anticorpo anti-centrômero e anti-Scl-70 que predizem a presença de ES (INSUA-VILARINO et al., 1993; LEE et al., 1993; WIGLEY & FLAVAHAN, 1996; SPENCER-GREEN et al., 1997).

O FR é caracterizado por vasoespasmo e nos pacientes com ES este fato se acrescenta aos vasos já estreitados pela proliferação da íntima e fibrose. Clinicamente observamos palidez, cianose e hiperemia no segmento afetado. A palidez reflete um vasoespasmo, a cianose resulta da remoção do oxigênio do sangue venoso estático e o rubor é causado pela hiperemia reativa que acompanha o retorno do fluxo sangüíneo (BELCH, 1991; SILVER, 1991; MITCHELL et al., 1997; HERRICK & CLARK, 1998). Nos pacientes com ES o FR pode ser complicado por isquemia digital manifestada por cicatrizes e ulcerações digitais (KAHALEH, 1995). A ocorrência de úlceras cutâneas de origem isquêmica e traumática é freqüente. As microulcerações em polpas digitais são de difícil cicatrização pelas alterações vasculares associadas, sendo sede de freqüentes infecções. Pode ocorrer reabsorção de falange distal e em casos mais graves gangrena e autoamputação (HERRICK et al., 1994; MITCHELL et al., 1997; HERRICK & CLARK, 1998).

A mesma vasculopatia encontrada na circulação periférica também é encontrada nas artérias terminais que suprem os rins, o coração, os pulmões e o trato gastrointestinal. Existe boa evidência de que uma consequência desta doença vascular é uma doença vasoespástica generalizada (FR sistêmico) envolvendo a circulação do rim, coração e provavelmente outras vísceras (WIGLEY & FLAVAHAN, 1996; WIGLEY, 1996; CIVITA et al., 1998; STAFFORD et al., 1998).

As manifestações articulares como artralgia, edema e eritema periarticular podem preceder o início da ES em 15% dos pacientes. Durante a doença a freqüência do envolvimento articular pode atingir 95% dos pacientes, porém sua forma de apresentação é muito variável, como poliartralgias de ritmo inflamatório, poliartrites e tenossinovites. Com a evolução da doença ocorrem contraturas em flexão e



reabsorção óssea das extremidades (SAMPAIO-BARROS, 1993; MITCHELL et al., 1997).

As manifestações musculares são representadas por miopatia inflamatória que acomete cerca de 10% dos pacientes, sendo devida a lesão microvascular (MITCHELL et al., 1997). A fraqueza e a atrofia muscular geralmente são devidas ao desuso e a cronicidade da doença (OLSEN et al., 1996).

A manifestação gastrointestinal mais comum é o envolvimento esofageano representado por disfagia e refluxo gastroesofágico devidos à incompetência do esfíncter esofageano inferior, assim como da disfunção ou dismotilidade da musculatura esofágica. Este refluxo pode levar à estenose esofágica em cerca de 40% dos pacientes (SJOGREN, 1996; YOUNG et al., 1996; MITCHELL et al., 1997). Outros achados estão relacionados à gastroparesia, síndrome de má absorção, pseudo-obstrução intestinal, pneumatose cística intestinal, constipação intestinal, tenesmo e incontinência fecal mais raramente. Sangramento gastrointestinal é raro sendo devido às telangiectasias gastrointestinais (SILVER, 1991; SAMPAIO-BARROS, 1993).

As manifestações pulmonares são de importância por representarem a primeira causa de morte em pacientes com ES. A fibrose intersticial é a alteração mais freqüente. A hipertensão pulmonar isolada ou associada à doença pulmonar intersticial, a pneumonia aspirativa, as telangiectasias das vias aéreas, o derrame ou espessamento pleural são outras manifestações (SILVER, 1991; SILVER, 1996; GURUBHAGAVATUBA & PALEVSKY, 1997).

As alterações pulmonares intersticiais ocorrem mais freqüentemente nos pacientes com ES forma difusa. Entretanto, os pacientes com ES forma limitada têm maior tendência a desenvolver hipertensão pulmonar isolada, ocorrendo em cerca de 10 a 40% destes pacientes (SILVER & MILLER, 1990; KANE et al., 1996; MITCHELL et al., 1997; OHTSUKA et al., 1997).

O envolvimento renal ocorre quase que exclusivamente em pacientes com ES difusa, sendo caracterizado por um declínio rápido da função renal, hipertensão acelerada, anemia hemolítica microangiopática e trombocitopenia. Cerca de 8% dos pacientes que desenvolvem crise renal dentro dos quatro primeiros anos de diagnóstico da doença, estão normalmente associados com doença de pele rapidamente progressiva (SILVER, 1991; STEEN, 1996). Com a introdução do uso de inibidores da

enzima de conversão do angiotensinogênio (destacando-se o captopril) a morbidade e mortalidade devidas a doença renal na ES foram sensivelmente reduzidas (STEEN, 1996; MITCHELL et al., 1997).

As manifestações cardíacas da ES podem incluir doença miocárdica, doença pericárdica, doença de sistema de condução ou arritmias cardíacas, sendo queixas freqüentes a fadiga, a dispnéia, as palpitações e a dor torácica atípica (SILVER, 1991; DESWAL & FOLLANSBEE, 1996; BYERS et al., 1997). O envolvimento cardíaco sintomático é fator de mau prognóstico na ES, com mortalidade de 60% em dois anos e 75% em cinco anos (SAMPAIO-BARROS, 1993).

O envolvimento do sistema nervoso na ES é bem reconhecido hoje. Mecanismos patogênicos diferentes talvez possam explicar a aparência multiforme do espectro clínico, como mononeurite, mononeurite múltipla e síndrome do túnel do carpo (CERINIC et al., 1996).

#### **3.1.4 Alterações laboratoriais**

As alterações laboratoriais observadas na ES assim como as manifestações clínicas são múltiplas. O hemograma revela anemia discreta e raramente leucopenia e trombocitopenia. Foram descritos casos de anemia hemolítica, pancitopenia, aplasia de medula (SAMPAIO-BARROS, 1993) e púrpura trombocitopênica (FROES et al., 1993).

As provas de atividade inflamatória como a velocidade de hemossedimentação (VHS), a proteína-C-reativa (PCR) e a  $\alpha$ 1-glicoproteína são inespecíficas, podendo estar elevadas nas fases ativas da doença, principalmente na forma difusa da ES. Os níveis de complemento (total e frações) costumam ser normais (SAMPAIO-BARROS, 1993).

A pesquisa dos auto-anticorpos é fundamental na ES, sendo o anticorpo antinuclear (ANA) positivo em até 98% dos pacientes principalmente quando é utilizado como substrato células Hep-2, revelando padrão nucleolar, pontilhado ou homogêneo à imunofluorescência (MÜHLEN & TAN, 1994; SPENCER-GREEN, 1997). Os auto-anticorpos circulantes de ação direta contra uma variedade de antígenos nucleares podem ser encontrados em muitos pacientes com ES (MÜHLEN & TAN, 1995).

Os anticorpos antinucleares que ocorrem na ES, podem ser divididos em três grupos principais, sendo considerados específicos para a doença (HARVEY &

McHUGH, 1999). Estes anticorpos antinucleares apresentam relação com o grau de espessamento de pele e com fatores clínicos associados à doença. São eles:

- o anticorpo anti-centrômero (ACA) que está presente em 44 a 98% dos pacientes com ES forma limitada, os quais apresentam envolvimento de pele limitado, relacionando-se com calcinose, telangiectasias, hipertensão pulmonar e pequena incidência de fibrose pulmonar (CATOGGIO et al., 1983; MÜHLEN & TAN, 1995; OKANO, 1996). Este anticorpo é extremamente raro na ES forma difusa (0 a 3% dos pacientes) (REIMER, 1990; SAMPAIO-BARROS et al., 1995).
- o anticorpo anti-Scl-70 (anti DNA-topoisomerase I) é encontrado em 28 a 75% dos pacientes com ES difusa, estando relacionado com envolvimento extenso de pele, contraturas articulares, crepitação tendínea, fibrose pulmonar e vasculopatia periférica. Na ES limitada ocorre em menos de 20% dos pacientes (WEINER et al., 1988; OKANO, 1996).
- o anticorpo anti-RNA polimerase I, II e III é encontrado na ES difusa sendo relacionado ao espessamento cutâneo mais intenso, contraturas articulares e maior incidência de envolvimento renal, com melhor resposta à penicilamina (OKANO et al., 1993; OKANO, 1996; MARQUES NETO & SAMPAIO-BARROS, 1998).

A presença de cada anticorpo é quase exclusiva, com exceção de poucos pacientes com concomitância dos anticorpos anti-Scl-70 e anti-RNA polimerase II (SAMPAIO-BARROS, 1995; OKANO, 1996).

Outros autoanticorpos, também têm sido detectados na ES com as seguintes associações clínicas segundo MEDSGER Jr. (MARQUES NETO & SAMPAIO-BARROS, 1998):

- o anti-fibrilarina (anti-U3RNP) com miosite, crepitação tendínea, envolvimento cardíaco e hipertensão pulmonar.
- o anti PM-Scl com síndrome de superposição polimiosite ou dermatomiosite.
- o anti Th/ToRNP (anti-7,2 RNP nucleolar) com ES limitada e hipertensão e fibrose pulmonar.
- o anti U1RNP com miosite, leucopenia e neuropatia do trigêmeo .

Os anticorpos anti-La e anti-Sm, o fator reumatóide e as células LE costumam ser negativos na ES. O anticorpo anti-Ro parece estar associado com rápida progressão do espessamento cutâneo e mau prognóstico visceral, principalmente pulmonar. O anticorpo anti-RNP quando presente, está em baixos títulos; se presente em títulos maiores que 1/1000, suspeitar de Doença Mista do Tecido Conjuntivo (DMTC) (SAMPAIO-BARROS, 1995).

Em função do órgão alvo atingido, outros exames podem ser solicitados.

### **3.1.5 Diagnóstico e classificação**

O diagnóstico da ES nem sempre é fácil de ser realizado, devido à variedade de alterações clínicas e laboratoriais da mesma.

Atendendo a necessidade de normas para a avaliação da doença, foram publicados em 1980 pelo Colégio Americano de Reumatologia, os critérios para o diagnóstico de ES (MASI et al., 1980).

Foram formulados os seguintes critérios:

- critério maior:
  - esclerodermia proximal
- critérios menores:
  - esclerodactilia
  - ulcerações de polpas digitais ou reabsorção de falanges distais
  - fibrose intersticial nas bases pulmonares

Para que o diagnóstico de ES seja feito é necessário apresentar o critério maior ou, pelo menos, dois critérios menores. Estes critérios apresentam uma sensibilidade de 97% e uma especificidade de 98%.

O melhor método para classificar os pacientes com ES é utilizar o grau e extensão do comprometimento cutâneo. A ES foi então subdividida em dois grupos: limitada e difusa. Este modelo de classificação é o mais utilizado atualmente (LeROY et al., 1988; STEEN & MEDSGER Jr., 1990, SAMPAIO-BARROS, 1993).

A forma difusa da ES apresenta envolvimento cutâneo generalizado e simétrico afetando tronco, face e extremidades, com tendência à rápida progressão das alterações cutâneas e comprometimento sistêmico precoce. A ocorrência do FR é de forma simultânea ao envolvimento da pele. Pode ocorrer a presença de anticorpo anti-

topoisomerase I (STEEN et al., 1988). As alterações da CPU, destruição e dilatação capilar no leito periungueal, são características da ES difusa (LeROY et al., 1988; SILVER, 1991).

A forma limitada da ES apresenta envolvimento cutâneo restrito e simétrico, afetando extremidades distais e face, com presença de calcinose e telangiectasias, incidência tardia de manifestações viscerais, podendo cursar com anticorpo anti-centrômero (STEEN et al., 1988). O FR geralmente antecede por anos as alterações de pele. As alças capilares periungueais observadas na CPU encontram-se dilatadas, geralmente sem desaparecimento de capilares (LeROY et al., 1988; SILVER, 1991). Esta forma limitada engloba a acroesclerose e a Síndrome CREST (calcinose, fenômeno de Raynaud, dismotilidade esofageana, esclerodactilia e telangiectasias) e suas variantes. Reúne também algumas formas que não preenchem os critérios diagnósticos do Colégio Americano de Reumatologia (MASI et al., 1980), como os pacientes sem envolvimento cutâneo que apresentam FR associado à presença de anticorpo anti-centrômero e/ou alterações da CPU, além da esclerodermia sem esclerodermia de Rodnan, onde não há espessamento de pele, mas ocorrem alterações viscerais, vasculares e sorológicas características da ES (SAMPAIO-BARROS, 1993; MITCHELL et al., 1997).

### **3.1.6 Tratamento**

O tratamento da ES é variável pela falta de uma terapêutica específica. Por este motivo podem ser utilizadas medidas como:

- cuidados gerais como proteção das mãos ao frio e ferimentos, medidas antirefluxo gastroesofágico (HERRICK, 1996),
- medicamentos para tratamento sintomático dos órgãos sistêmicos envolvidos como os antiinflamatórios não hormonais e os corticóides estes de uso restrito à fase edematosa inicial e em doses baixas para tratar miosites, artrites e serosites, pois pode aumentar a incidência de crise renal (MEDSGER Jr., 1991),
- antagonistas dos canais de cálcio como nifedipina e diltiazem, para controle do fenômeno de Raynaud (POPE, 1996; CERINIC et al., 1997),

- inibidores da enzima conversora da angiotensina como o captopril, essencial para as crises renais (MEDSGER Jr., 1991),
- bloqueadores H<sub>2</sub>, inibidores da bomba de prótons e agentes procinéticos para os sintomas gastroesofágicos (MEDSGER Jr, 1991; HERRICK, 1996) ,
- medicamentos modificadores da doença como imunossupressores, agentes citotóxicos (ciclofosfamida), agentes antifibrinolíticos (asiaticosídeo, D penicilamina), colchicina, prostaglandinas e análogos da prostaciclina (POPE, 1996; BOLSTER & SILVER, 1999),
- terapêuticas alternativas como plasmaferese e transplantes intradérmicos de fibroblastos heterólogos (MARQUES NETO & SAMPAIO-BARROS, 1998).

### **3.1.7 Prognóstico**

A sobrevida dos pacientes com ES nos primeiros cinco anos subsequentes ao diagnóstico é de 60 a 70%, diminuindo para 40 a 50% nos 10 anos subsequentes (STEEN, 1990).

Os fatores que aumentam a sobrevida incluem o diagnóstico precoce da doença, melhoria das modalidades terapêuticas e advento de novas classes de medicamentos como os inibidores da enzima conversora da angiotensina (captopril), que aumentaram a sobrevida dos pacientes de ES com crise renal (SEIBOLD, 1996).

Os fatores preditivos de um pior prognóstico são: sexo masculino, raça negra, ES difusa, acometimento visceral rapidamente progressivo (pulmões, coração, rins) e acometimento cutâneo rapidamente progressivo em pacientes mais jovens (BARNETT et al., 1988; ALTMAN et al., 1991; SILMAN, 1997; JACOBSEN et al., 1998).

## **3.2 POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS**

O número e a capacidade funcional dos leucócitos do sangue periférico refletem o estado global da competência imunológica do indivíduo. A especificidade das respostas imunes se deve aos linfócitos, que são as únicas células do corpo capazes de reconhecimento e distinção específicos dos determinantes antigênicos (ABBAS et al., 1995).

Os linfócitos embora pareçam morfologicamente similares, apresentam subgrupos distintos que são bastante diferentes em suas funções e produtos proteicos. Os principais subgrupos de linfócitos incluem os linfócitos T, os linfócitos B e os linfócitos “natural killer” (NK) (ABBAS et al., 1995; OWENS et al., 1995). Estas células de populações funcionalmente distintas expressam diferentes proteínas de membrana que servem como marcadores fenotípicos, caracterizando as diferentes populações linfocitárias. Com o desenvolvimento dos anticorpos monoclonais contra tais proteínas de membrana foi possível identificar e isolar estas populações. Para designar os anticorpos monoclonais utiliza-se a nomenclatura CD (“cluster of differentiation”) seguido de um número, que define as diferentes etapas de diferenciação celular (ALPERT et al., 1987; KEREN, 1994; OWENS et al., 1995).

Os linfócitos T são originários da medula óssea a partir de um precursor linfóide, que é caracterizado pela expressão de HLA-DR e CD34 em sua superfície e TdT (deoxinucleotidiltransferase terminal) intranuclear (BEHM, 1996). O reconhecimento mais precoce dos linfócitos T (pró-timócitos) é expresso pelos antígenos de superfície CD2 e CD7, assim como pelo antígeno citoplasmático CD3, que é a marca desta linhagem. Após sua permanência na medula óssea os precursores dos linfócitos T migram para o timo onde ocorre sua diferenciação (PARASKEVAS & FOERSTER, 1993; TERSTAPPEN, 1994; PIRRUCCELLO & JOHNSON, 1994).

Durante a maturação no timo surge a expressão de superfície do CD3 (pan-linfócito T) que está presente em todos os linfócitos T maduros. Nesta fase, sofrem rearranjos genéticos designados a gerar os receptores funcionais dos linfócitos T – os receptores de célula T (TCR), que são compostos pelos heterodímeros  $\alpha$  e  $\beta$  ou, menos comumente  $\gamma$  e  $\delta$ , em associação com o complexo CD3 (PIRRUCCELLO & JOHNSON, 1994; ORFAO & BUITRAGO, 1995; BEHM, 1996).

Este processo é acompanhado pela expressão de vários antígenos associados ao linfócito T, incluindo o CD5, o CD1 dos timócitos, o CD4 dos linfócitos T auxiliares/indutores e o CD8 dos linfócitos T supressores/citotóxicos (MACEY, 1994; PIRRUCCELLO & JOHNSON, 1994).

Nos estágios iniciais de expressão do complexo TCR-CD3, os linfócitos T tímicos co-expressam CD4 e CD8. Estas células sofrem seleção negativa e positiva para função apropriada de sua expressão de TCR. Durante este processo, tanto o CD4

como o CD8 são selecionados para manter a expressão de superfície baseado no TCR, se classe I ou II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) (PIRRUCCELLO & JOHNSON, 1994; ORFAO & BUITRAGO, 1995).

Após a seleção tímica, menos de 1% dos linfócitos T gerados no timo sobrevivem e migram para a circulação. Estes linfócitos T são encaminhados para o epitélio intestinal, pele e para compor a população do sangue periférico, podendo emigrar para órgãos linfóides como o baço e os linfonodos após a estimulação antigênica. Nesta seqüência, estas células são identificadas através dos anticorpos monoclonais específicos contra antígenos associados ao linfócito T. Na circulação os linfócitos T “virgens” de antígeno são reconhecidos pela expressão CD45RA e os que sofreram estimulação antigênica pela expressão CD45RO. Após a estimulação antigênica e a ativação dos linfócitos T, outros antígenos são expressos e servem como seus marcadores de ativação como o CD25 (cadeia  $\alpha$  do receptor de interleucina-2), o CD26, o CD30, o CD71 (receptor da transferrina) e o HLA-DR (receptor do Complexo Principal de Histocompatibilidade classe II) (BARCLAY et al., 1993; GALÉA et al., 1994; BREZINSCHKE et al., 1995; REGO, 1997). O CD25 é um marcador de ativação precoce, pode ser detectado em 24 horas, mas o seu pico de expressão não ultrapassa 72 horas. O HLA-DR é expresso a partir de uma semana após a estimulação e é detectado na superfície das células por várias semanas (BEACOCK – SHARP et al., 1998).

Os linfócitos T participam ativamente nos processos de imunidade celular e na regulação da síntese de anticorpos, sendo responsáveis por importantes papéis na regulação da resposta imunológica. São subdivididos em populações funcionalmente distintas, das quais são melhor definidas as dos linfócitos T auxiliares/indutores e dos linfócitos T supressores/citotóxicos com base na expressão de seus diferentes antígenos de superfície celular denominados CD4 e CD8, respectivamente. Estas células possuem uma especificidade pouco usual pelos antígenos, reconhecendo apenas os peptídeos aderidos a proteínas codificadas no Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) expresso na superfície das células. Os linfócitos T CD8 reconhecem determinantes da classe I do CPH e os linfócitos T CD4 reconhecem determinantes da classe II (PARASKEVAS & FOERSTER, 1993; ABBAS et al., 1995).



Os linfócitos T auxiliares CD4 desempenham o papel mais importante na modulação da resposta imunológica, pois estão relacionados ao desenvolvimento do linfócito T citotóxico, à diferenciação do linfócito B em célula plasmática, bem como na liberação de IL-2 e ativação de macrófagos (ALPERT et al., 1987; BOCKENSTEDT et al., 1987; PARASKEVAS & FOERSTER, 1993; ABBAS et al., 1995).

A subpopulação de linfócitos T com marcador CD8 é representada por células com potencial citotóxico (lisam células que produzem antígenos estranhos) ou supressor (inibem a resposta imune dos linfócitos T e B), mas em geral estas células só se tornam funcionantes sob ação dos linfócitos T CD4 auxiliares ou de seus produtos solúveis (ALPERT et al., 1987; BOCKENSTEDT et al., 1987).

O segundo subgrupo principal de linfócitos consiste dos linfócitos B que se originam na medula óssea, a partir de uma célula tronco que não produz imunoglobulina (Ig) e é caracterizada pela expressão de HLA-DR, CD19 e CD34 em sua superfície e TdT intranuclear (BEHM, 1996). Os precursores dos linfócitos B expressam CD22 e CD79a citoplasmático. Durante a sua maturação ocorre o rearranjo do gene de Ig resultando na expressão de Ig de membrana que são seus receptores antigênicos, o que lhe confere especificidade (PARASKEVAS & FOERSTER, 1993; PIRRUCCELLO & JOHNSON, 1994; TERSTAPPEN, 1994).

Outro fator da diferenciação inicial dos linfócitos B na medula óssea é a expressão do CD24 e do CD10 ou CALLA (antígeno comum da leucemia linfoblástica aguda). Este último antígeno é expresso durante o período de rearranjo até a expressão do gene do receptor de Ig. Na primeira fase ocorre rearranjo do gene da cadeia pesada de Ig levando à expressão citoplasmática de IgM e expressão de membrana de CD22. Em seguida, o linfócito B sofre rearranjo do gene de cadeia leve da Ig, resultando na expressão de IgM de superfície com ambas as cadeias leve e pesada da Ig. Após a aquisição da Ig de superfície, os linfócitos B da medula óssea perdem a expressão de CD10 e de TdT e adquirem outras expressões de superfície como CD20, CD21, CD37 e CD40 (PARASKEVAS & FOERSTER, 1993; BEHM, 1996). Quando isto ocorre, estas células migram para fora da medula óssea, podendo ser encontrados na circulação periférica e nos tecidos linfóides. A interação de antígenos com as moléculas de Ig de membrana do linfócito B maduro inicia a seqüência de ativação dos mesmos, que culmina com o desenvolvimento de células efetoras

(plasmócitos) que ativamente secretam moléculas de anticorpos e linfócitos B de memória. Os linfócitos B são identificados pela presença de CD19 (pan-linfócito B), que é expresso muito precocemente durante o desenvolvimento destas células e é perdido exatamente antes da formação das células plasmáticas após a estimulação antigênica. A fase de transformação do linfócito B em célula plasmática é acompanhada pela perda da maioria dos antígenos associados à linhagem B, incluindo HLA-DR e Ig de superfície. Tipicamente, a célula plasmática expressa em sua superfície os marcadores de ativação CD38 e CD138 (PIRRUCCELLO & JOHNSON, 1994; ORFAO & BUITRAGO, 1995).

A função primordial dos linfócitos B é a resposta imune humoral com a produção de Ig (anticorpos) e sua ausência ou redução, pode causar ausência ou produção insuficiente de anticorpos. A ativação destes linfócitos pelos antígenos nos órgãos linfóides primários, conduzem à secreção de anticorpos pelas células plasmáticas derivadas deste linfócitos B. Os anticorpos reconhecem principalmente determinantes conformacionais de moléculas complexas e, em princípio, não necessitam apresentação antigênica por células especializadas (PARASKEVAS & FOERSTER, 1993; ABBAS, 1995).

O terceiro subgrupo principal de linfócitos é fenotipicamente diferente dos anteriores. Estes linfócitos não expressam marcadores nem para linfócitos T e nem para linfócitos B e são denominados linfócitos “natural killer”. Os linfócitos NK são originados de um precursor hematopoético na medula óssea e quando maturam passam para a circulação e tecidos linfóides. A maioria destes linfócitos se caracteriza fenotipicamente pela expressão de CD2 e CD7. Diferente dos linfócitos T, os linfócitos NK não expressam CD3, CD4 ou CD5. Os linfócitos NK maduros são heterogêneos expressando diferentes antígenos como CD16, CD56, CD57 e em baixa densidade o CD8. Como não foi identificado nenhum anticorpo reagindo somente com o subgrupo NK de linfócitos, estes podem ser identificados usando uma combinação de reagentes – CD3, CD16 e/ou CD56, sendo sua representação fenotípica CD3– CD16+ e/ou CD56+ (BARCLAY et al., 1993; MACEY, 1994; PIRRUCCCELLO & JOHNSON, 1994; OWENS & LOKEN, 1995).

Funcionalmente, os linfócitos NK são identificados como um tipo de linfócitos que promovem a primeira linha de defesa contra patógenos virais e células alteradas.

Os linfócitos NK são capazes de reconhecer e lisar uma grande variedade de células alteradas como certas células tumorais e células normais infectadas por vírus sem que haja estimulação antigênica óbvia (ABBAS, 1995).

### **3.3 POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NA ESCLEROSE SISTÊMICA**

Os linfócitos, grandes reguladores da resposta imunológica, parecem desenvolver papel de suma importância na patogênese da ES. Os estudos histopatológicos de pacientes com ES foram os primeiros a sugerir que as alterações na imunidade celular pudessem ter um papel importante nesta patogênese, desde que demonstraram um proeminente infiltrado de linfócitos nos tecidos ativamente envolvidos pela ES (FLEISHMAJER et al., 1977; JIMÉNEZ, 1983; LEE et al., 1984).

A pele dos pacientes com ES, apresentava infiltração de linfócitos T nos espaços intersticiais e perivasculares. Estes infiltrados precediam os achados característicos da vasculopatia de pequenos vasos e da fibrose dérmica (ROUMM et al., 1984).

Em decorrência destas observações vários estudos têm sido realizados analisando a população de linfócitos circulantes e sua função nos pacientes com ES. Vários autores na década de 70 (De JESUS et al., 1975; HUGHES et al., 1979; GUPTA et al., 1979), tentaram confirmar a hipótese na qual os linfócitos representam um papel de suma importância na produção das alterações patológicas da ES, através do estudo dos subtipos de linfócitos do sangue periférico. Demonstraram uma diminuição de linfócitos T circulantes e correlacionaram esta diminuição com a severidade do envolvimento visceral, sugerindo que a intensa infiltração destas células nos tecidos seria responsável pela sua diminuição na circulação.

Outros estudos tentaram explorar melhor as alterações funcionais dos linfócitos no sangue de pacientes com ES, como os realizados por ALARCON-SEGOVIA et al. (1981), onde a única alteração significativa demonstrada foi o aumento na função dos linfócitos T auxiliares. Da mesma forma as pesquisas de INOSHITA et al. (1981) demonstraram uma redução significativa do número total de linfócitos T na circulação de pacientes com ES e aumento na função dos linfócitos T auxiliares.

Na investigação do papel dos linfócitos T supressores na ES, WHITESIDE et al. (1983) e KEYSTONE et al. (1982) encontraram elevação na relação linfócitos T auxiliares/supressores que poderia ser devido à redução do número de linfócitos T supressores quando comparados com os controles. Porém, este fato pode não estar diretamente relacionado à patogênese da doença, principalmente pela falta de correlação entre o número de linfócitos T supressores e a atividade da doença.

Em 1984, ROUMM et al. e LEE et al. estudando os linfócitos acumulados na derme dos pacientes com ES, observaram que a maioria dos linfócitos encontrados eram linfócitos T e raramente linfócitos B. Outro achado destes estudos foi a elevação na razão entre linfócitos T auxiliares/supressores no sangue periférico devido à diminuição no número dos linfócitos T supressores. Estes pacientes mostraram-se significativamente mais ativos sorologicamente, pelo menos com respeito à frequência dos anticorpos antinucleares. No entanto, os autores não observaram correlação entre a razão linfócitos T auxiliares/supressores na pele ou no sangue periférico e o grau de espessamento da pele e envolvimento dos órgãos internos.

O aumento da função das células T auxiliares, estudadas através de outros marcadores, também tem sido demonstrado em estudos "in vitro", como observaram UMEHARA et al. (1988). Os autores encontraram um aumento significativo na produção de IL-2 pelos linfócitos T auxiliares no sangue periférico de pacientes com ES, quando estimulados pela fitohemaglutinina. Foi demonstrada uma razão significativamente maior entre linfócitos T auxiliares/supressores nos pacientes com ES em relação aos indivíduos normais. Todavia, foi demonstrado que os linfócitos T auxiliares dos pacientes com ES produziram significativamente mais IL-2 do que as mesmas células de indivíduos normais, indicando que os linfócitos T auxiliares dos pacientes não estavam apenas aumentados em número mas também apresentavam hiperatividade.

Ao estudarem a IL-2 foi observado que a sua presença no soro de pacientes com ES prova o papel da ativação dos linfócitos T nesta doença (KAHALEH et al., 1988; KAHALEH et al., 1989; KAHALEH, 1990). Os autores observaram associação entre os níveis séricos de IL-2 e a progressão da doença, indicando que os linfócitos T provavelmente também podem participar nesta progressão.

Outra forma de avaliar a ativação dos linfócitos em pacientes com ES, foi realizada por KAHAN et al. (1989) utilizando as expressões (c-myc, c-myb e c-ras) de proto-oncogênese nos linfócitos T e B do sangue periférico. Os autores encontraram um aumento significativo da expressão dos proto-oncogenes nos linfócitos T mas não nos linfócitos B, diferindo dos achados encontrados nos pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico. Este aumento tende a ser maior nos pacientes com doença ativa inicial e poderia estar relacionado à patogênese da doença.

Em 1990, POSTLETHWAITE apresentou uma revisão dos eventos imunes iniciais nos pacientes com ES. Naqueles com doença de curta duração (menos de seis anos) ocorria uma redução na porcentagem dos linfócitos T supressores resultando em um aumento na razão linfócitos T auxiliares/supressores. Esta redução no número de linfócitos T supressores poderia ser devida à diminuição nos níveis de linfócitos NK, que também possuem antígeno de superfície CD8. O autor relatou um estudo onde foi usado o clone T5 para marcação de linfócitos T supressores, mais específico para linfócitos T supressores/citotóxicos e que revelou uma redução não significativa na porcentagem de linfócitos que portavam este marcador. Todavia, a razão T4/T5 (linfócitos T auxiliares/supressores-citotóxico) estava significativamente aumentada nos pacientes com ES, sugerindo a existência de um desequilíbrio entre os linfócitos auxiliares e supressores. Com relação aos linfócitos NK relatou a ocorrência de redução no número destes linfócitos nos pacientes com doença inicial.

Nestes trabalhos anteriores a identificação das subpopulações linfocitárias estava sendo realizada através da aplicação da técnica de imunofluorescência indireta e anticorpos monoclonais variáveis de acordo com o objetivo da pesquisa. Com o advento da técnica de citometria de fluxo e a padronização da nomenclatura dos anticorpos monoclonais, os trabalhos passaram a apresentar uma padronização para comparação dos resultados.

GUSTAFSSON et al. (1990) estudaram os linfócitos de pacientes com ES utilizando a citometria de fluxo e encontraram elevação da razão dos linfócitos T CD4 auxiliares/CD8 supressores nos pacientes quando comparados aos controles, devido à diminuição do número de linfócitos T CD8. O número relativo de linfócitos T supressores (CD11b+CD8+) foi normal, mas a contagem absoluta destas células foi levemente reduzida. Os linfócitos T indutores da supressão, definidos como linfócitos

CD45R+CD4+, eram em média a metade dos níveis observados nos controles. Estes achados não apresentaram relação com a atividade inflamatória. A diminuição dos linfócitos T indutores da supressão foi mais pronunciada na fase tardia e nos pacientes com forma limitada da doença.

O marcador de ativação HLA-DR estava aumentado nos linfócitos T CD4 e CD8 dos pacientes com duração de doença menor que dois anos. Os linfócitos T ativados (HLA-DR+) foram vistos em todos os estágios do processo esclerodérmico, em especial durante os estágios iniciais da doença e em pacientes que sofreram exposição ocupacional ao pó de sílica. O aumento na proporção dos linfócitos T ativados foi relacionado com a alteração da função de intestino delgado, mas não apresentou relação com o grau de envolvimento de pele ou pulmão. Segundo os autores, todos estes achados favorecem a hipótese do envolvimento da imunidade mediada pelos linfócitos T na patogênese e perpetuação da ES.

SAKAMOTO et al. (1992) analisaram os receptores de célula T (TCR) duplo-negativos (CD4- e CD8-) nos linfócitos do sangue periférico de pacientes com ES. Os TCR  $\alpha/\beta$  positivos estavam geralmente associados com as moléculas CD4 e CD8 envolvidas no Complexo Principal de Histocompatibilidade classe II e classe I, respectivamente, para reconhecimento restrito das células T. Nos pacientes com ES observaram aumento do número dos linfócitos T  $\alpha/\beta$  duplo negativos, com um repertório restrito do gene V $\beta$  do TCR, quando comparados aos controles. Estas células poderiam ter papel significativo na progressão da autoimunidade, já que no Lupus Eritematoso Sistêmico os linfócitos T  $\alpha/\beta$  duplo negativos parecem estar correlacionados com o aumento da produção de autoanticorpos anti-DNA.

FIOCCO et al. (1993) estudaram diferentes moléculas acessórias de ativação (CD26, CD29, CD45RA, CD25, MLR4, HLA-DR) dos linfócitos T CD4+ e CD8+ no sangue periférico de pacientes com ES, comparando-os com controles normais e portadores de outras doenças do tecido conjuntivo (Artrite Reumatóide e Lupus Eritematoso Sistêmico). Observaram aumento da porcentagem e do número absoluto de linfócitos CD4+CD26+ e CD4+CD25+ e diminuição da porcentagem de linfócitos CD8+CD29+ quando comparados com os controles. Encontraram também, correlação entre o aumento da porcentagem de linfócitos T CD4+CD26+ e do número absoluto de linfócitos T, com a atividade da doença. Os subgrupos de linfócitos T CD4+CD29+ e

CD4+CD45RA+ não apresentaram alteração nos pacientes com ES, porém os linfócitos T CD8+CD29+ estavam reduzidos com relação aos controles. Os autores sugerem que as distintas vias de ativação dos linfócitos T auxiliares de memória nos pacientes com evolução rápida da doença, poderiam confirmar o papel do mecanismo mediado pelos linfócitos T na progressão da ES.

Para autores como MARCO BRUNS et al. (1994), os linfócitos T auxiliares na ES estão ativados possivelmente devido a diminuição dos níveis de linfócitos T supressores e dos linfócitos NK. Os linfócitos T auxiliares aumentados poderiam estimular de forma policlonal os linfócitos B, que por sua vez produziram altas quantidades de autoanticorpos. Seus achados confirmam o conceito de que as citocinas e os fatores de crescimento derivados dos linfócitos T auxiliares, estimulam a síntese da matriz proteica pelos fibroblastos, resultando em fibrose generalizada que é característica da ES.

No sangue periférico de pacientes com ES são observados linfócitos T ativados, sendo estes linfócitos mais propensos a sofrer mutações do que o restante dos linfócitos T pela sua rápida divisão "in vivo". Baseados neste fato, SFIKAKIS et al. (1994) estudaram a frequência "in vivo" de linfócitos T mutantes para o gene hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase (hprt) no sangue periférico de pacientes com ES e determinaram os fenotipos dos linfócitos T mutantes e não mutantes (selvagens). Os autores observaram nos pacientes com ES, que 91% dos clones de linfócitos T selvagens, assim como 84% dos clones de linfócitos T mutantes para o gene hprt, eram linfócitos T auxiliares. Esta aparente preponderância dos clones de linfócitos T CD4+ pode ser devida ao fato de que estes são clonados mais facilmente que os linfócitos T CD8+. A ocorrência de frequência aumentada dos linfócitos T mutantes "in vivo" no sangue periférico de pacientes com ES, sugere divisões como também sobrevida aumentada dos linfócitos T circulantes. Os autores sugerem que a seleção dos linfócitos T mutantes no sangue periférico desses pacientes poderia ser usada na identificação do estímulo gatilho para a ativação dos linfócitos T nesta doença.

Com relação ao número e ativação dos linfócitos NK, HOLCOMBE et al. (1995), utilizando antígeno CD56 para sua detecção, observaram que a proporção de linfócitos expressando CD56 não apresentou valores diferentes estatisticamente entre os

pacientes com ES e os controles normais. Porém, encontraram uma proporção menor destes valores nos pacientes com menos de três anos de doença e nos pacientes com doença difusa especialmente nos que expressaram anticorpo anti-Scl-70.

Em 1992, KANTOR et al. avaliaram os linfócitos T, NK e LAK (“lymphokine-activated killer” – matadores ativados por linfocinas) no sangue periférico de pacientes com ES, tendo sido evidenciado contagem normal do número total de linfócitos. Todavia, entre os linfócitos T, observaram uma diminuição no número de linfócitos T CD8+ em relação aos controles, exceto nos pacientes com ES difusa em fase tardia (mais de três anos de doença). A relação linfócitos T CD4/CD8 estava significativamente aumentada em relação aos controles normais. Não foram observadas diferenças no número de linfócitos T CD4+, CD3+CD29+ (linfócitos T de memória), CD3+CD45RA+ (linfócitos T virgens) e CD3+CD25+ (linfócitos T ativados) nos pacientes comparados com os controles. Entre os linfócitos NK ocorreu apenas diminuição dos linfócitos CD56+CD16– e aumento do número de linfócitos NK DR+CD16+ (ativado). A atividade dos linfócitos LAK foi significativamente diminuída nos pacientes com ES principalmente na forma difusa, talvez devida a fatores inibidores presentes no soro destes pacientes, bloqueando a resposta dos linfócitos à IL-2 exógena.

Baseados nas observações que os linfócitos T CD4+ estão presentes em maior número do que os linfócitos T CD8+ na pele dos pacientes com ES (WHITE, 1995), estudou-se o cruzamento de ratos de pele espessada (Tsk/+) com ratos com deficiência de linfócitos T CD4+ e observaram uma marcada redução na celularidade da pele e na fibrose, mas apresentaram anticorpo anti-topoisomerase I. Em contraste, no cruzamento de ratos com pele espessada (Tsk/+) com ratos com deficiência de linfócitos T CD8+ ocorreram pequenas alterações no envolvimento da pele, mas houve grande redução nos níveis de anticorpos anti-topoisomerase I, sugerindo que os linfócitos T CD4+ estão envolvidos na fibrose da pele e os linfócitos T CD8+ estão envolvidos na produção de anticorpos anti-topoisomerase I neste modelo animal de ES.

Como observado nesta revisão da literatura, não existe um consenso quanto às subpopulações linfocitárias envolvidas na patogênese da ES, ou mesmo sua correlação com o momento clínico evolutivo da doença.



## **4 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

## 4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 4.1 PACIENTES

Foram selecionados e analisados 42 pacientes atendidos no ambulatório de Reumatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, no período de outubro de 1997 a setembro de 1999, todos portadores de ES, preenchendo os critérios diagnósticos propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia (MASI et al., 1980). A forma clínica da doença foi classificada como difusa ou limitada segundo a classificação proposta por LeROY et al. (1988). A duração de três anos de doença foi escolhida como ponto divisor entre doença recente e tardia (HOLCOMBE et al., 1995).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e recebeu o consentimento assinado dos pacientes que dele participaram.

Trinta e oito pacientes (90,5%) eram do sexo feminino e 4 (9,5%) eram do sexo masculino, com idade média de  $43,3 \pm 9,2$  anos (média  $\pm$  desvio padrão), sendo a mínima de 15 e a máxima de 58 anos. Com relação à raça, este grupo incluiu 38 pacientes (90,5%) da raça branca e 4 (9,5%) da raça negra. A idade dos pacientes por ocasião do início da doença variou de 11 a 54 anos, com média de  $37,5 \pm 9,5$  anos. O tempo de duração da doença até a época da análise dos dados variou de 1 a 30 anos com média de  $6,1 \pm 5,5$  anos, considerando-se aqui o tempo de aparecimento dos primeiros sintomas atribuídos à ES.

Quanto à forma clínica da ES, 23 pacientes (54,7%) apresentaram a forma difusa, destes 21 eram mulheres e 2 homens. A forma limitada foi presente em 19 pacientes (45,3%), sendo 17 mulheres e 2 homens.

Dezesseis pacientes (38,1%) eram portadores de ES recente e 26 (61,9%) de ES tardia.

Foram analisados no presente estudo as seguintes manifestações clínicas e laboratoriais dos comprometimentos: cutâneo, articular, vascular, muscular, gastrointestinal, pulmonar, cardíaco e renal. Para caracterização de cada comprometimento foram utilizadas as seguintes definições (MITCHELL et al., 1997):

- comprometimento cutâneo: calcinose, telangiectasia, distúrbios de pigmentação, endurecimento da pele com estabelecimento do escore cutâneo total pelo método original de Rodnan (SAMPAIO-BARROS, 1997).
- comprometimento articular: artrite e/ou acrosteólise (reabsorção espontânea de falanges distais) à radiografia de mãos.
- comprometimento vascular: ulceração de polpas digitais e reabsorção de falanges distais ou necrose extensa e/ou amputação.
- comprometimento muscular: fraqueza muscular acompanhada de elevação das enzimas musculares.
- comprometimento gastrointestinal:
  - esôfago: disfagia, com hipomotilidade esofágica ao exame radiológico contrastado do esôfago, estômago e duodeno.
  - intestino: alteração do hábito intestinal, acompanhado de defeito de motilidade ao exame de trânsito intestinal ou enema opaco.
- comprometimento pulmonar:
  - Doença Pulmonar Restritiva (DPR): queixa clínica de dispnéia progressiva aos esforços associada à presença de infiltrado intersticial em bases pulmonares na radiografia de tórax ou defeito ventilatório restritivo à prova de função pulmonar.
  - Hipertensão Pulmonar (HP): aumento da pressão pulmonar documentado pelo ecocardiograma, isolada ou associada à DPR.
- comprometimento cardíaco: insuficiência cardíaca congestiva, pericardite ou arritmia assintomática.
- comprometimento renal: proteinúria, hipertensão arterial, diminuição da função renal e crise renal esclerodérmica (insuficiência renal aguda e hipertensão arterial).

Nenhum dos pacientes estava recebendo terapia imunossupressora na época do estudo. Foram incluídos apenas os pacientes que estavam recebendo prednisona em doses baixas (5 a 10 mg diários).

Foram excluídos os pacientes com Esclerodermia localizada; Esclerodermia em Síndrome de Superposição com outra Doença de Tecido Conjuntivo (BENNETT, 1990); Doença Mista do Tecido Conjuntivo (BENNETT, 1990; GRANIER et al., 1986); Doença

Indiferenciada do Tecido Conjuntivo (LeROY, et al., 1980); Fascíte Eosinofílica (RODNAN et al., 1975) e qualquer estado esclerodermóide induzido por agentes químicos e ambientais.

Foi realizada capilaroscopia periungueal e pesquisa dos seguintes parâmetros imunes: anticorpo antinuclear, anticorpo anti-Scl-70, anticorpo anti-centrômero, anticorpo anti-Ro, anticorpo anti-La, anticorpo anti-RNP, anticorpo anti-Sm e marcadores linfocitários (CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD45RA, CD56, CD71, HLA-DR, TCR $\alpha/\beta$  e TCR $\gamma/\delta$ ).

Previamente à realização dos exames foi solicitado aos pacientes que não fumassem por 2 horas antes e não ingerissem bebida alcoólica por 12 horas antes, para não interferir na realização dos marcadores linfocitários. O horário da coleta sangüínea foi das 8 às 9 horas, devido à variação da contagem linfocitária (NICHOLSON et al, 1994). Também foi orientado que não retirassem suas cutículas por pelo menos 2 semanas prévias ao exame, pois, é descrito que tal procedimento afeta a rede vascular periungueal (ANDRADE, 1987; MARICQ, 1981).

Foi coletado de cada paciente 20 ml de sangue venoso em tubo Vacutainer®, sendo divididos em 2 frascos de 5 ml com EDTA Tripotássico (K3) 0,2M, pH 7,4 (NICHOLSON et al., 1994) e um frasco de 10 ml sem anticoagulante para obtenção de soro.

Das amostras de sangue com EDTA, o primeiro tubo destinou-se à realização do hemograma com contagem total de leucócitos e linfócitos realizado no Laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Paraná, utilizando o método de contagem eletrônica com equipamento Coulter STKS (Coulter Electronics, Hialeah, Florida, EUA), calibrado regularmente com o Reagente 4c.

O segundo tubo destinou-se à análise dos linfócitos através da citometria de fluxo, que foi realizado no Laboratório de Imunofenotipagem do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, utilizando o aparelho FACS Vantage (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, California, EUA).

O tubo com o sangue sem anticoagulante foi mantido à temperatura ambiente por um período de 30 minutos ou até a coagulação completa, a seguir foi centrifugado a 5.000 rpm por 4 minutos no Centrifugador CELM, sendo o soro dividido em alíquotas. Após serem alíquotadas, as amostras foram armazenadas à temperatura de -20°C,

para posterior dosagem dos auto-anticorpos, que foi realizada no Laboratório de Imunopatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

## **4.2 GRUPO CONTROLE**

O grupo controle foi selecionado entre funcionários e médicos residentes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, todos saudáveis e não fumantes. Um total de 28 indivíduos foi pareado com os pacientes, de acordo com o sexo, a classificação racial e a maior proximidade possível de idade. Destes, 20 indivíduos (71,4%) eram mulheres e 8 (28,6%) homens, com idade média de  $37 \pm 7,2$  anos, sendo a mínima de 27 e a máxima de 53 anos. Com relação à raça, foram incluídos 25 indivíduos (89,3%) da raça branca e 3 (10,7%) da raça negra. A coleta do sangue, seu destino e armazenamento, foram iguais aos dos pacientes.

## **4.3 MÉTODOS**

### **4.3.1 Auto-anticorpos**

#### **4.3.1.1 Anticorpo antinuclear e anticorpo anticentrômero**

Os anticorpos antinucleares foram investigados pela técnica de imunofluorescência indireta conforme descrito na literatura (TAN et al., 1977; MOLDEN et al., 1984; TAN, 1989), usando como substrato células Hep-2 (kit WAMA, São Paulo, Brasil). O anticorpo anticentrômero foi detectado da mesma forma. Um padrão nuclear nítido na diluição 1:40 foi considerado positivo.

#### **4.3.1.2 Anticorpo anti-Scl-70**

O anticorpo anti-Scl-70 foi detectado por ELISA (enzima-imunoensaio) conforme descrito na literatura (TAN et al., 1980), utilizando o kit HEMAGEN (São Paulo – Brasil).

#### **4.3.1.3 Anticorpos anti-RNP, anti-Sm, anti-Ro e anti-La**

Os anticorpos do perfil ENA (antígeno nuclear solúvel) foram detectados através da técnica de Imunodifusão Dupla de Ouchterlony (WILSON & SANDERS, 1992), nas lâminas com gel, utilizando como fonte antigênica o extrato de baço de vitelo (Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brasil).

#### **4.3.2 Capilaroscopia periungueal (CPU)**

A CPU foi realizada segundo a técnica descrita em relatos anteriores da literatura (MARICQ, 1981; MARICQ & MAIZE, 1982; LEE et al., 1983; HOUTMAN et al., 1986; ANDRADE, 1987; ERCOLE, 1993). Consiste na observação microscópica do leito capilar periungueal utilizando um microscópio biocular de visão estereoscópica de Leitz-Wetzlar com aumento de 12,5 vezes. Como fonte luminosa foi utilizada uma lâmpada incandescente de tungstênio de baixa voltagem e como meio diafanizador o óleo secante Colorama.

O objetivo do exame foi determinar o tipo de padrão capilaroscópico do paciente:

- padrão normal: sem alterações capilaroscópicas periungueais (ANDRADE, 1987).
- padrão esclerodérmico (SD): dilatação das alças capilares e áreas de deleção vascular no leito periungueal (MARICQ & MAIZE, 1982; ERCOLE, 1993).
- padrão indiferenciado: alterações inespecíficas nos capilares periungueais (ERCOLE & RACHID, 1996).

#### **4.3.3 Identificação das subpopulações linfocitárias**

A identificação das subpopulações linfocitárias foi realizada através da citometria de fluxo, utilizando a técnica de imunofluorescência direta em sangue periférico total, com exceção do CD45RA que foi realizado utilizando a técnica de imunofluorescência indireta (ORFAO & BUITRAGO, 1995).

#### 4.3.3.1 Anticorpos monoclonais

Para avaliação da expressão antigênica celular, foram empregados os seguintes anticorpos monoclonais apresentados na Tabela 1.

**TABELA 1**  
**ANTICORPOS MONOCLONAIS E AS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS**  
**CORRESPONDENTES**

<b>Anticorpos monoclonais</b>	<b>Subpopulações linfocitárias</b>
CD3+	Pan linfócito T
CD3+CD4+	Linfócito T auxiliador/indutor
CD3+CD8+	Linfócito T supressor/citotóxico
CD3+CD4+CD8+	Linfócito T com dupla expressão positiva
CD3+CD4-CD8-	Linfócito T com dupla expressão negativa
CD45RA+	Molécula acessória de ativação
CD4+CD45RA+	Linfócito T auxiliador virgem
CD8+CD45RA+	Linfócito T supressor virgem
CD25+	Molécula acessória de ativação – receptor IL-2
CD4+CD25+	Linfócito T auxiliador ativado
CD8+CD25+	Linfócito T supressor ativado
CD4+HLA-DR+	Linfócito T auxiliador ativado com receptor CPH
CD8+HLA-DR+	Linfócito T supressor ativado com receptor CPH
CD3+TCR $\alpha/\beta$	Receptor linfócito T $\alpha/\beta$
CD3+TCR $\gamma/\delta$	Receptor linfócito T $\gamma/\delta$
CD2+	Pan linfócito T
CD71+	Molécula acessória de ativação – receptor transferrina
CD19+	Pan linfócito B
CD56+	Linfócito NK

Os anticorpos monoclonais foram previamente conjugados com os fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e ficoeritrina/cianina 5 (PECy5) ou peridina clorofilada (PerCP) ou terceira cor (TC):

- CD2 (MT910 – PE) (DAKO, Dinamarca).
- CD3 (S4.1 – TC) (CALTAG, EUA).
- CD4 (MT310 – PE) (DAKO, Dinamarca).
- CD4 (SK3 – FITC) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, EUA).
- CD8 (3B5 – TC) (CALTAG, EUA).

- CD19 (HD37 – PECy5) (DAKO, Dinamarca).
- CD25 (2A3 – FITC) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, EUA).
- CD45 (T29/33 – FITC) (DAKO, Dinamarca).
- CD45RA (L48 – PURO) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, EUA).
- CD56 (My31 – PE) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, EUA).
- CD71 (L01.1 – FITC) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, EUA).
- HLA-DR (Immu-357 – PE) (Immunotech, França).
- HLA-DR (L243 – PerCP) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, EUA).
- TCR $\alpha/\beta$  (WT31 – FITC) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, EUA).
- TCR $\gamma/\delta$  (11F2 – PE) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, EUA).
- CD8/HLA-DR (SK1/L243 – FITC/PE) (Simultest<sup>®</sup>, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, EUA).
- CD4/CD8/CD3 (13B8.2/B9.11/UCH7.1 – FITC/PE/PECy5) (Opticlone<sup>®</sup>, Immunotech, França).
- IgG1/IgG1/IgG1 (679.1Mc7/679.1Mc7/679.1Mc7 – FITC/PE/PECy5) (Opticlone<sup>®</sup>, Immunotech, França).

Foi utilizado a IgG F(ab')<sub>2</sub> de camundongo conjugada com FITC (CALTAG, EUA) no estudo por imunofluorescência indireta.

#### **4.3.3.2 Caracterização imunofenotípica**

As células foram preparadas para imunofluorescência direta pela técnica de “cora e lisa” (REGO, 1997):

- 1- Homogeneizou-se o sangue periférico do tubo com anticoagulante EDTA por 15 minutos.
- 2- Ajustou-se a concentração de leucócitos para  $1 \times 10^6$  de células/ml e pipetou-se 100  $\mu$ l de sangue em cada tubo. O número de leucócitos foi obtido da contagem realizada no hemograma.



- 3- Pipetou-se os anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos, previamente titulados para saturação dos antígenos, em ambiente protegido da luz direta. As combinações utilizadas foram:
  - 1° tubo – IgG1-FITC / IgG1-PE / IgG1-PECy5.
  - 2° tubo – CD45RA-FITC / CD4-PE / CD8-TC.
  - 3° tubo – CD25-FITC / CD4-PE / CD8-TC.
  - 4° tubo – CD8-FITC / HLA-DR-PE / CD19-TC.
  - 5° tubo – CD4-FITC / HLA-DR-PE / CD8-TC.
  - 6° tubo – CD71-FITC / CD2-PE / CD8-TC.
  - 7° tubo – TCR $\alpha/\beta$  - FITC / TCR $\gamma/\delta$ -PE / CD3-TC.
  - 8° tubo – CD45-FITC / CD56- PE / HLA-DR-PerCP.
  - 9° tubo – CD4-FITC / CD8-PE / CD3-PECy5.
- 4- Agitou-se delicadamente.
- 5- Incubou-se por 15 minutos à temperatura ambiente no escuro.
- 6- Adicionou-se 1 ml de tampão hemolítico FACS Lysing Solution (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, EUA) em cada tubo.
- 7- Homogeneizou-se por alguns segundos em mixer Vortex – Biomatic..
- 8- Incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente no escuro.
- 9- Centrifugou-se a 2000 rpm por 5 minutos (Centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206-R, Fanem)
- 10- Descartou-se o sobrenadante, ficando um botão de leucócitos no fundo do tubo.
- 11- Lavou-se os leucócitos adicionando 3 ml de PBS com pH em torno de 7,2 a 7,4.
- 12- Agitou-se no mixer por alguns segundos e após, centrifugou-se a 2000 rpm por 5 minutos.
- 13- Descartou-se o sobrenadante.
- 14- Ressuspendeu-se as células adicionando 1 ml de PBS.
- 15- Guardou-se na geladeira a 4-8° C protegido da luz, até a leitura, que foi realizada no máximo em 4 horas.

Para o tubo número 2 (CD45RA-FITC/CD4-PE/CD8-TC) utilizou-se a técnica de imunofluorescência indireta (REGO, 1997) onde após o passo 5, procedeu-se da seguinte forma:

- 1- Lavou-se com 3 ml de PBS.
- 2- Centrifugou-se a 2000 rpm por 5 minutos (Centrifuga Excelsa Baby II, modelo 206-R, Fanem).
- 3- Retirou-se o sobrenadante.
- 4- Adicionou-se 10 µl de conjugado IgG F (ab')<sub>2</sub> e incubou-se por 15 minutos à temperatura ambiente no escuro.

A partir desta fase procedeu-se da mesma forma que na técnica de imunofluorescência direta a partir do passo 6.

#### **4.3.3.3 Citometria de fluxo**

A contagem das células preparadas pelas técnicas de imunofluorescência direta ou indireta foi realizada por citometria de fluxo (McCOY, 1994; OWENS & LOKEN, 1995) utilizando o citômetro de fluxo FACS Vantage (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, EUA), equipado com o laser "INNOVA Enterprise Ion LASER" (Coherent, USA) ajustado para 488 nm e potência de 80 mW. A calibração do instrumento foi realizada através de protocolo que engloba o alinhamento prévio com pérolas padronizadas (CaliBRITE3<sup>®</sup> – Becton Dickinson Immunocytometry Systems, EUA) e compensação com controle negativo (imunoglobulinas isotípicas) e controle positivo (combinação CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PECy5) (MACEDO et al., 1995).

Foram adquiridas 15.000 células em cada tubo, através do programa de computador LYSYS II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, EUA).

Os dados adquiridos pelo citômetro foram analisados em microcomputador Macintosh 7600/132 empregando-se o programa de computador Paint-A-Gate PRO (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, EUA), com SSC (Side Scatter Scan) transformado (TERSTAPPEN et al., 1990).

Os resultados finais foram dados em porcentagem do número de linfócitos.

#### **4.3.4 Análise estatística**

Para comparações de grupos quando de variáveis quantitativas, utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk (WALPOLE & MEYERS, 1978) onde foi testada a hipótese nula de distribuição normal versus a hipótese alternativa de distribuição diferente da normal, para cada uma das variáveis consideradas.

Quando não houve rejeição da hipótese de normalidade em ambos os grupos sob comparação, foi utilizado o teste “t de Student” para amostras independentes (WALPOLE & MEYERS, 1978). No caso de rejeição da hipótese de normalidade em um ou ambos os grupos, considerou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney (SIEGEL, 1975).

Para verificar a independência entre duas variáveis qualitativas, utilizou-se o teste Exato de Fisher (BOX et al, 1978) e investigou-se a significância das variáveis conjuntamente através do modelo de regressão Logística (KLEINBAUM, 1994).

Em todos os testes o nível de significância adotado foi de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## **5 RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

### 5.1 DADOS CLÍNICOS

As manifestações clínicas foram avaliadas de acordo com as formas clínicas difusa e limitada da ES.

O comprometimento cutâneo foi observado em todos os pacientes analisados com relação ao espessamento de pele não ocorrendo diferença estatística significativa quanto à forma clínica. As telangiectasias observadas em 12 pacientes (52,2%) com ES forma difusa e 14 (73,7%) com forma limitada comportaram-se da mesma forma. Calcinose não foi observada nos pacientes em estudo.

Dos 42 pacientes, 18 apresentaram comprometimento articular, sendo 14 (60,9%) com ES difusa e 4 (21,1%) com forma limitada, mostrando correlação estatística significativa da manifestação articular com a ES difusa ( $p < 0,05$ ).

O comprometimento vascular esteve presente em 22 pacientes, dos quais 15 (65,2%) apresentavam forma difusa da ES e 7 (36,8%) forma limitada, sem apresentar associação estatística significativa entre elas.

As manifestações musculares próprias da ES foram presentes em 2 (8,7%) pacientes com ES forma difusa, sem significado estatístico.

Das manifestações gastrointestinais as esofágicas ocorreram em 34 pacientes dos quais 21 (91,3%) com a forma difusa e 13 (68,4%) com a forma limitada da ES, sem correlação estatística significativa entre as formas clínicas. Quatro pacientes (21,1%) com a forma limitada da ES tiveram manifestações intestinais, ocorrendo diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

O comprometimento pulmonar representado pela Doença Pulmonar Restritiva (DPR) e Hipertensão Pulmonar (HP), não apresentou correlação com a forma clínica da ES. Doze pacientes apresentaram DPR sendo 8 (34,8%) com ES difusa e 4 (21,1%) com a forma limitada. HP ocorreu em 2 pacientes (10,5%) com ES limitada.

As manifestações cardíacas foram presentes em 13 pacientes, 9 (39,1%) com ES difusa e 4 (21,1%) com ES limitada, sem diferença estatística significativa.

O comprometimento renal foi presente em 5 pacientes (21,7%) com ES difusa, tendo diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). Destes apenas 2 pacientes desenvolveram insuficiência renal aguda, caracterizando a crise renal esclerodérmica.

## **5.2 AUTO-ANTICORPOS**

### **5.2.1 Anticorpo antinuclear**

O ANA foi positivo em 33 pacientes (78,6%) sendo 21 com ES difusa e 12 com forma limitada. Houve associação estatística significativa entre o padrão centromérico e a ES limitada ( $p < 0,05$ ). Quanto aos outros padrões de ANA, não foi observada associação com a forma clínica.

### **5.2.2 Anticorpo anti- Scl-70**

O anti-Scl-70 esteve presente em 11 pacientes (26,2%), todos com a forma difusa da ES, demonstrando associação estatística significativa do anticorpo com a forma clínica ( $p < 0,05$ ).

### **5.2.3 Anticorpo anticentrômero**

O ACA foi positivo em 6 pacientes, sendo todos com a forma limitada da ES, ocorrendo associação estatística significativa entre ACA e ES limitada ( $p < 0,05$ ).

### **5.2.4 Anticorpo anti-Ro**

Este anticorpo foi observado em 12 pacientes, sendo 6 com ES difusa e 6 com ES limitada, não observou-se diferença estatística significativa.

### **5.2.5 Anticorpo anti-RNP**

O anti-RNP foi presente em um paciente com ES limitada, não ocorrendo diferença estatística significativa.

### **5.2.6 Anticorpo anti-La e anti-Sm**

Estes anticorpos foram negativos em todos os pacientes.

## **5.3 CAPILAROSCOPIA PERIUNGUEAL**

A CPU foi realizada nos 42 pacientes com ES onde foram observados 3 padrões capilaroscópicos (SD, normal e indiferenciado), estando estes correlacionados às formas clínicas da ES.

O padrão SD esteve presente em 19 pacientes com a forma difusa e 10 com a forma limitada da ES, demonstrando associação estatisticamente significativa deste padrão com a forma difusa da doença ( $p < 0,05$ ).

O padrão normal foi observado em um paciente com ES difusa e 9 com ES limitada, com correlação estatística significativa entre ES limitada e padrão normal ( $p < 0,05$ ).

O padrão indiferenciado foi observado em 3 pacientes com a forma difusa, não ocorrendo diferença estatística significativa entre as formas clínicas.

## **5.4 SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS**

### **5.4.1 Comparação entre as subpopulações linfocitárias do grupo de pacientes com ES e do grupo controle**

Encontrou-se aumento estatisticamente significativo nas porcentagens dos marcadores de ativação de linfócitos T CD4+HLA-DR+ ( $p < 0,05$ ) e CD8+HLA-DR+

( $p<0,01$ ) no sangue periférico dos pacientes com ES com relação aos do grupo controle, enquanto que, a proporção de linfócitos T CD3+TCR $\gamma/\delta$  ( $p<0,05$ ) esteve significativamente diminuída. Também observaram-se diminuídas as porcentagens de linfócitos CD19+ ( $p<0,05$ ) e CD56+ ( $p<0,01$ ) no grupo com ES, sendo estatisticamente significativa esta diferença com o grupo controle (Tabela 2).

**TABELA 2**  
**SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS DO GRUPO DE PACIENTES E DO**  
**GRUPO CONTROLE**

Subpopulação Linfocitária	ES (% $\pm$ D.P.) N=42	Grupo Controle (% $\pm$ D.P.) N=28	p
CD3+	69,53 $\pm$ 10,53	68,28 $\pm$ 6,91	NS
CD3+CD4+	44,48 $\pm$ 8,00	41,73 $\pm$ 5,66	NS
CD3+CD8+	21,63 $\pm$ 8,09	22,41 $\pm$ 7,84	NS
CD3+CD4+CD8+	0,19 $\pm$ 0,23	0,15 $\pm$ 0,11	NS
CD3+CD4-CD8-	2,21 $\pm$ 1,83	2,65 $\pm$ 1,57	NS
CD45RA+	94,66 $\pm$ 2,32	94,22 $\pm$ 2,61	NS
CD4+CD45RA+	44,22 $\pm$ 8,39	41,55 $\pm$ 5,82	NS
CD8+CD45RA+	21,64 $\pm$ 8,11	22,41 $\pm$ 7,84	NS
CD25+	1,83 $\pm$ 0,82	1,80 $\pm$ 0,50	NS
CD4+CD25+	1,69 $\pm$ 0,78	1,47 $\pm$ 0,51	NS
CD8+CD25+	0,00	0,00	-
CD4+HLA-DR+	3,32 $\pm$ 2,01	2,51 $\pm$ 1,23	$p<0,05$
CD8+HLA-DR+	4,01 $\pm$ 3,09	2,03 $\pm$ 1,40	$p<0,01$
CD3+TCR $\alpha/\beta$	67,27 $\pm$ 9,41	65,19 $\pm$ 6,85	NS
CD3+TCR $\gamma/\delta$	2,52 $\pm$ 2,25	3,53 $\pm$ 2,05	$p<0,05$
CD2+	78,45 $\pm$ 6,67	76,59 $\pm$ 4,30	NS
CD71+	23,19 $\pm$ 8,22	22,59 $\pm$ 7,85	NS
CD19+	8,73 $\pm$ 5,48	10,88 $\pm$ 4,71	$p<0,05$
CD56+	5,29 $\pm$ 4,84	7,81 $\pm$ 3,53	$p<0,01$

D.P.= desvio-padrão

NS= não significativo

#### 5.4.2 Correlação entre as subpopulações linfocitárias e as formas clínicas da ES

Ao serem comparadas as subpopulações de linfócitos dos pacientes com ES difusa e do grupo controle observou-se aumento no percentual dos linfócitos T com marcadores de ativação CD4+HLA-DR+ ( $p<0,01$ ) e CD8+HLA-DR+ ( $p<0,01$ ). Os



linfócitos T com expressão CD3+TCR $\gamma/\delta$  ( $p<0,01$ ) estavam em proporções diminuídas, assim como os linfócitos NK CD56+ ( $p<0,01$ ) (Tabela 3).

**TABELA 3**  
**SUPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NA FORMA DIFUSA DA ES E NO GRUPO CONTROLE**

Subpopulações linfocitárias	ES Difusa (% $\pm$ D.P.) N=23	Grupo Controle (% $\pm$ D.P.) N=28	p
CD3+	69,79 $\pm$ 10,38	68,27 $\pm$ 6,90	NS
CD3+CD4+	42,89 $\pm$ 8,35	41,73 $\pm$ 5,66	NS
CD3+CD8+	23,36 $\pm$ 9,35	22,41 $\pm$ 7,84	NS
CD3+CD4+CD8+	0,23 $\pm$ 0,30	0,15 $\pm$ 0,11	NS
CD3+CD4-CD8-	1,65 $\pm$ 0,84	2,64 $\pm$ 1,57	NS
CD45RA+	94,60 $\pm$ 2,49	94,21 $\pm$ 2,61	NS
CD4+CD45RA+	43,41 $\pm$ 8,25	41,55 $\pm$ 5,82	NS
CD8+CD45RA+	23,39 $\pm$ 9,39	22,41 $\pm$ 7,84	NS
CD25+	1,97 $\pm$ 0,98	1,80 $\pm$ 0,50	NS
CD4+CD25+	1,82 $\pm$ 0,91	1,47 $\pm$ 0,51	NS
CD8+CD25+	0,00	0,00	-
CD4+HLA-DR+	4,03 $\pm$ 2,40	2,51 $\pm$ 1,23	$p<0,01$
CD8+HLA-DR+	4,74 $\pm$ 3,48	2,03 $\pm$ 1,40	$p<0,01$
CD3+TCR $\alpha/\beta$	66,65 $\pm$ 11,22	65,18 $\pm$ 6,85	NS
CD3+TCR $\gamma/\delta$	1,90 $\pm$ 1,11	3,52 $\pm$ 2,05	$p<0,01$
CD2+	79,24 $\pm$ 7,55	76,58 $\pm$ 4,30	NS
CD71+	24,88 $\pm$ 9,34	22,58 $\pm$ 7,85	NS
CD19+	9,12 $\pm$ 6,35	10,87 $\pm$ 4,91	NS
CD56+	4,76 $\pm$ 5,48	7,81 $\pm$ 0,11	$p<0,01$
D.P.= desvio padrão      NS= não significativo			

Foram também comparadas as subpopulações linfocitárias dos pacientes com a forma limitada da ES e do grupo controle. Foi encontrado aumento na população de linfócitos T CD3+CD4+ ( $p<0,05$ ), com diminuição dos linfócitos CD19+ ( $p<0,05$ ) no grupo de pacientes (Tabela 4).

**TABELA 4**  
**SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NA FORMA LIMITADA DA ES E NO GRUPO**  
**CONTROLE**

Subpopulações linfocitárias	ES Limitada (%±D.P.) N=19	Grupo Controle (%±D.P.) N=28	p
CD3+	69,21±10,97	68,27±6,90	NS
CD3+CD4+	46,41±7,32	41,73±5,66	p<0,05
CD3+CD8+	19,53±5,79	22,41±7,84	NS
CD3+CD4+CD8+	0,13±0,08	0,15±0,11	NS
CD3+CD4-CD8-	2,88±2,43	2,64±1,57	NS
CD45 RA+	94,73±2,17	94,21±2,61	NS
CD4+CD45RA+	45,20±8,69	41,55±5,82	NS
CD8+CD45RA+	19,52±5,76	22,41±7,84	NS
CD25+	1,66±0,56	1,80±0,50	NS
CD4+CD25+	1,52±0,57	1,47±0,51	NS
CD8+CD25+	0,00	0,00	-
CD4+HLA-DR+	2,45±0,83	2,51±1,23	NS
CD8+HLA-DR+	3,12±2,33	2,03±1,40	NS
CD3+TCR $\alpha/\beta$	68,01±6,84	65,18±6,85	NS
CD3+TCR $\gamma/\delta$	3,26±2,98	3,52±2,05	NS
CD2+	77,47±5,46	76,58±4,30	NS
CD71+	21,13±6,26	22,58±7,85	NS
CD19+	8,25±4,33	10,87±4,91	p<0,05
CD56+	5,93±3,99	7,81±0,11	NS

D.P.= desvio padrão

NS= não significativo

Quando foram correlacionadas as subpopulações linfocitárias das formas clínicas difusa e limitada da ES, observou-se na forma difusa diminuição das porcentagens de linfócitos T CD3+CD4+ (p<0,05) e aumento de linfócitos T CD4+HLA-DR+ (p<0,01) (Tabela 5).

**TABELA 5**  
**SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS E AS FORMAS CLÍNICAS DA ES**

Subpopulações linfocitárias	ES Difusa (%±D.P.) N=23	ES Limitada (%±D.P.) N=19	p
CD3+	69,79±10,38	69,21±10,97	NS
CD3+CD4+	42,89±8,35	46,41±7,32	p<0,05
CD3+CD8+	23,36±9,35	19,53±5,79	NS
CD3+CD4+CD8+	0,23±0,30	0,13±0,08	NS
CD3+CD4-CD8-	1,65±0,84	2,88±2,43	NS
CD45RA+	94,60±2,49	94,73±2,17	NS
CD4+CD45RA+	43,41±8,25	45,20±8,69	NS
CD8+CD45RA+	23,39±9,39	19,52±5,76	NS
CD25+	1,97±0,98	1,60±0,56	NS
CD4+CD25+	1,82±0,91	1,52±0,57	NS
CD8+CD25+	0,00	0,00	-
CD4+HLA-DR+	4,03±2,40	2,45±0,83	p<0,01
CD8+HLA-DR+	4,74±3,48	3,12±2,33	NS
CD3+TCR $\alpha/\beta$	66,65±11,22	68,01±6,84	NS
CD3+TCR $\gamma/\delta$	1,90±1,11	3,26±2,98	NS
CD2+	79,24±7,55	77,47±5,46	NS
CD71+	24,88±9,34	21,13±6,26	NS
CD19+	9,12±6,35	8,25±4,33	NS
CD56+	4,76±5,48	5,93±3,99	NS

D.P.= desvio padrão

NS= não significativo

#### 5.4.3 Correlação entre as subpopulações linfocitárias e a duração da ES

Quando comparou-se as subpopulações linfocitárias dos pacientes com ES recente às do grupo controle, encontrou-se aumento do marcador de ativação CD8+HLA-DR+ (p<0,05) e ocorreu diminuição dos linfócitos CD19+ (p<0,05) (Tabela 6).

**TABELA 6**  
**SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NOS PACIENTES COM ES RECENTE E NO**  
**GRUPO CONTROLE**

Subpopulações linfocitárias	ES Recente (%±D.P.) N=16	Grupo controle (%±D.P.) N=28	p
CD3+	68,28±8,99	68,28±6,90	NS
CD3+CD4+	42,10±8,61	41,73±5,66	NS
CD3+CD8+	20,94±7,22	22,41±7,84	NS
CD3+CD4+CD8+	0,20±0,18	0,15±0,11	NS
CD3+CD4-CD8-	2,64±2,61	2,65±1,57	NS
CD45RA+	94,17±2,82	94,22±2,61	NS
CD4+CD45RA+	41,16±9,41	41,55±5,82	NS
CD8+CD45RA+	20,92±7,20	22,41±7,84	NS
CD25+	1,70±0,64	1,80±0,50	NS
CD4+CD25+	1,65±0,66	1,47±0,51	NS
CD8+CD25+	0,00	0,00	NS
CD4+HLA-DR+	2,82±1,76	2,51±1,23	NS
CD8+HLA-DR+	3,64±2,52	2,03±1,40	p<0,05
CD3+TCR $\alpha/\beta$	64,16±9,65	65,19±6,85	NS
CD3+TCR $\gamma/\delta$	3,18±3,24	3,53±2,05	NS
CD2+	78,01±7,50	76,59±4,30	NS
CD71+	22,90±7,37	22,59±7,85	NS
CD19+	8,32±6,80	10,88±4,71	p<0,05
CD56+	8,65±5,67	7,81±3,53	NS

D.P.= desvio padrão

NS= não significativo

Com relação à ES fase tardia, quando comparadas as subpopulações destas às do grupo controle, foi observado aumento dos linfócitos T CD3+CD4+ (p<0,05) e diminuição dos linfócitos T CD3+TCR $\gamma/\delta$  (p<0,05). Das moléculas de ativação observou-se aumento dos linfócitos T CD4+CD45RA+ (p<0,05), CD4+HLA-DR+ (p<0,05) e CD8+HLA-DR+ (p<0,01). Os linfócitos NK CD56+ (p<0,01) estavam diminuídos no grupo de pacientes (Tabela 7).

**TABELA 7**  
**SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS NOS PACIENTES COM ES TARDIA E NO**  
**GRUPO CONTROLE**

Subpopulações linfocitárias	ES Tardia (%±D.P.) N=26	Grupo controle (%±D.P.) N=28	p
CD3+	70,29±11,47	68,28±6,90	NS
CD3+CD4+	45,94±7,40	41,73±5,66	p<0,05
CD3+CD8+	22,05±8,68	22,41±7,84	NS
CD3+CD4+CD8+	0,17±0,26	0,15±0,11	NS
CD3+CD4-CD8-	1,94±1,11	2,65±1,57	NS
CD45RA+	94,95±1,95	94,22±2,61	NS
CD4+CD45RA+	46,10±7,26	41,55±5,82	p<0,05
CD8+CD45RA+	22,08±8,73	22,41±7,84	NS
CD25+	1,91±0,92	1,80±0,50	NS
CD4+CD25+	1,71±0,86	1,47±0,51	NS
CD8+CD25+	0,00	0,00	NS
CD4+HLA-DR+	3,61±2,12	2,51±1,23	p<0,05
CD8+HLA-DR+	4,24±3,42	2,03±1,40	p<0,01
CD3+TCR $\alpha/\beta$	69,17±8,92	65,19±6,85	NS
CD3+TCR $\gamma/\delta$	2,11±1,24	3,53±2,05	P<0,05
CD2+	78,70±6,24	76,59±4,30	NS
CD71+	23,36±8,84	22,59±7,85	NS
CD19+	8,98±4,62	10,88±4,71	NS
CD56+	3,23±2,74	7,81±3,53	p<0,001

D.P.= desvio padrão

NS= não significativo

Na ES tardia foram menores as porcentagens de linfócitos NK CD56+ (p<0,001) quando comparadas com as encontradas nos pacientes com ES recente (Tabela 8).

**TABELA 8**  
**SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS E A DURAÇÃO DA ES**

Subpopulações linfocitárias	ES Recente (%±D.P.) N=16	ES Tardia (%±D.P.) N=26	p
CD3+	68,28±8,99	70,29±11,47	NS
CD3+CD4+	42,10±8,61	45,94±7,40	NS
CD3+CD8+	20,94±7,22	22,05±8,68	NS
CD3+CD4+CD8+	0,20±0,18	0,17±0,26	NS
CD3+CD4-CD8-	2,64±2,61	1,94±1,11	NS
CD45RA+	94,17±2,82	94,95±1,95	NS
CD4+CD45RA+	41,16±9,41	46,10±7,26	NS
CD8+CD45RA+	20,92±7,20	22,08±8,73	NS
CD25+	1,70±0,64	1,91±0,92	NS
CD4+CD25+	1,65±0,66	1,71±0,86	NS
CD8+CD25+	0,00	0,00	NS
CD4+HLA-DR+	2,82±1,76	3,61±2,12	NS
CD8+HLA-DR+	3,64±2,52	4,24±3,42	NS
CD3+TCR $\alpha/\beta$	64,16±9,65	69,17±8,92	NS
CD3+TCR $\gamma/\delta$	3,18±3,24	2,11±1,24	NS
CD2+	78,01±7,50	78,70±6,24	NS
CD71+	22,90±7,37	23,36±8,84	NS
CD19+	8,32±6,80	8,98±4,62	NS
CD56+	8,65±5,67	3,23±2,74	p<0,001
D.P.= desvio padrão	NS= não significativo		

#### 5.4.4 Correlação entre as subpopulações linfocitárias e a presença de anticorpo anti-Scl-70

Nos pacientes portadores de anticorpo anti-Scl-70 foi encontrado diminuição dos linfócitos T CD3+TCR $\gamma/\delta$  (p<0,05) quando comparados aos pacientes sem este anticorpo (Tabela 9).

**TABELA 9**  
**SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS E A PRESENÇA DE ANTICORPO**  
**Anti-ScI-70**

Subpopulações linfocitárias	ES com Anti- ScI-70 (%±D.P.) N=11	ES sem Anti- ScI-70 (%±D.P.) N=31	p
CD3+	71,64±8,56	68,78±11,18	NS
CD3+CD4+	43,61±8,05	44,79±8,10	NS
CD3+CD8+	24,65±10,59	20,56±6,89	NS
CD3+CD4+CD8+	0,11±0,10	0,21±0,26	NS
CD3+CD4-CD8-	1,57±0,74	2,44±2,05	NS
CD45RA+	95,66±1,65	94,30±2,45	NS
CD4+CD45RA+	46,17±8,33	43,53±8,45	NS
CD8+CD45RA+	24,72±10,66	20,55±6,88	NS
CD25+	1,89±0,69	1,81±0,88	NS
CD4+CD25+	1,63 ±0,61	1,71±0,85	NS
CD8+CD25+	0,00	0,00	-
CD4+HLA-DR+	3,45±2,17	3,27±1,99	NS
CD8+HLA-DR+	5,17±3,92	3,60±2,70	NS
CD3+TCR $\alpha/\beta$	67,10±10,14	67,33±9,32	NS
CD3+TCR $\gamma/\delta$	2,52±2,25	3,53±2,05	p<0,05
CD2+	81,05±6,96	77,52±6,43	NS
CD71+	25,85±10,75	22,24±7,10	NS
CD19+	8,24±3,29	8,91±6,11	NS
CD56+	5,62±7,41	5,18±3,70	NS
D.P.= desvio padrão	NS= não significativo		

#### 5.4.5 Correlação entre as subpopulações linfocitárias e a presença de anticorpo anticentrômero

Foi encontrado diminuição das moléculas de ativação dos linfócitos T CD4+HLA-DR+ (p<0,05) nos pacientes com ES portadores de ACA quando comparados aos pacientes com ES sem ACA (Tabela 10).

**TABELA 10**  
**SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS E A PRESENÇA DE ANTICORPO**  
**ANTICENTRÔMERO**

Subpopulações linfocitárias	ES com ACA (%±D.P.) N=6	ES sem ACA (%±D.P.) N=36	p
CD3+	75,85±3,81	68,48±10,95	NS
CD3+CD4+	48,18±4,16	43,87±8,36	NS
CD3+CD8+	21,47±6,50	21,66±8,40	NS
CD3+CD4+CD8+	0,14±0,07	0,20±0,25	NS
CD3+CD4-CD8-	4,17±3,84	1,89±1,04	NS
CD45RA+	93,87±2,96	94,76±2,23	NS
CD4+CD45RA+	43,93±9,09	44,27±8,41	NS
CD8+CD45RA+	21,42±6,42	21,68±8,44	NS
CD25+	1,38±0,76	1,11±0,96	NS
CD4+CD25+	1,22±0,23	1,77±0,82	NS
CD8+CD25+	0,00	0,00	-
CD4+HLA-DR+	2,23±0,46	3,50±2,11	p<0,05
CD8+HLA-DR+	4,25±2,91	3,98±3,16	NS
CD3+TCR $\alpha/\beta$	72,75±6,69	66,42±9,61	NS
CD3+TCR $\gamma/\delta$	4,38±4,29	2,21±1,62	NS
CD2+	82,75±3,55	77,73±6,83	NS
CD71+	23,22±6,57	23,18±8,55	NS
CD19+	5,68±2,12	9,24±5,72	NS
CD56+	5,57±3,06	5,25±5,11	NS

D.P.= desvio padrão

NS= não significativo

#### 5.4.6 Correlação entre as subpopulações linfocitárias e as manifestações clínicas da ES

Foi observada associação estatisticamente significativa entre os pacientes que apresentavam comprometimento muscular ( $p<0,05$ ) e comprometimento pulmonar tipo DPR ( $p<0,05$ ) e diminuição de linfócitos T CD3+TCR $\gamma/\delta$ .

As manifestações clínicas articular, cutânea, vascular, pulmonar tipo HP, cardíaca e renal não apresentaram correlação estatística significativa com as subpopulações linfocitárias.



## 6 DISCUSSÃO

## 6 DISCUSSÃO

Na última década, tornou-se claro que a ativação do sistema imune desempenha um papel fundamental no surgimento da lesão tecidual nos pacientes com ES, todavia, permanece a dúvida se esta ativação do sistema imune é um evento inicial ou epifenômeno.

Na patogênese da ES, as interações entre os linfócitos, as células endoteliais e os fibroblastos são consideradas como ponto central destas alterações (SATO, 1999). Os linfócitos T são as células envolvidas no desenvolvimento da lesão tecidual na ES. Nos infiltrados inflamatórios dos tecidos de pacientes com ES há predomínio de linfócitos T ativados, sendo estes reguladores da função de muitas células hematopoiéticas e não hematopoiéticas, incluindo células endoteliais e fibroblastos (WHITE, 1996).

O papel desempenhado pelas diferentes subpopulações linfocitárias presentes no sangue periférico de pacientes com ES não está bem definido, existindo divergências entre os relatos encontrados na literatura quanto ao número e à função dos linfócitos na patogênese da doença (WHITE, 1996) e a sua correlação com a clínica.

### 6.1 DADOS DEMOGRÁFICOS

A distribuição por sexo dos pacientes estudados apresentou algumas características esperadas para a doença, como o predomínio do sexo feminino na razão de 9,5:1 (feminino:masculino). Estes achados correspondem aos de STEEN & MEDSGER Jr. (1990) e SAMPAIO-BARROS (1993). A razão sexual foi maior nos pacientes com ES forma difusa (10,5:1) que com forma limitada (8,5:1), diferindo dos relatos de SAMPAIO-BARROS (1993).

A população estudada apresentou distribuições de idade semelhantes nos grupos controle e de pacientes com ES, não ocorrendo diferença estatisticamente significativa entre as médias dos dois grupos, porque houve limitação proposital da

idade no grupo controle, para que as subpopulações linfocitárias não fossem afetadas pela variável idade. O pico de incidência da ES nos 42 pacientes estudados situou-se entre a quarta e a quinta década de vida, como também relatado por STEEN (1990), SAMPAIO-BARROS (1993) e SEIBOLD (1994). Em alguns trabalhos observou-se incidência mais significativa entre a quarta e a sexta década (STEEN & MEDSGER Jr., 1990; STEEN, 1990).

A incidência da ES foi maior na raça branca na razão 9,5:1 (branca:negra), como em outras séries de pacientes brasileiros (MARQUES NETO & SAMARA, 1985; SAMPAIO-BARROS, 1993). Nos EUA, embora a incidência da ES seja maior em negros, esta diferença é muito pequena (STEEN & MEDSGER Jr., 1990).

## 6.2 DADOS CLÍNICOS

As alterações cutâneas foram as manifestações clínicas mais freqüentes nos pacientes com ES neste estudo e nos relatos de SILVER (1991), BELCH (1991), SAMPAIO-BARROS (1993) e MITCHELL et al. (1997).

A presença de espessamento de pele ocorreu em todos os 42 pacientes estudados, não apresentando variação quanto à forma clínica da doença, confirmando a importância da presença desta manifestação para o diagnóstico da ES (SEIBOLD & McCLOSKEY, 1997).

As telangiectasias foram observadas tanto na ES limitada quanto na ES difusa, sem associação estatística significativa. STEEN et al. (1988), descrevem associação das telangiectasias com a ES limitada, enquanto que MITCHELL et al. (1997), referem não ter encontrado predomínio em nenhuma forma clínica, como observado neste estudo.

Com relação à calcinose, esta não foi observada nos pacientes aqui analisados. Na literatura observa-se predomínio desta manifestação nos pacientes com ES limitada (LeROY et al., 1988; MEDSGER Jr., 1991), em pacientes com doença de longa duração e anticorpo anticentrômero (STEEN et al., 1988; SAMPAIO-BARROS, 1993).

Todos os 42 pacientes avaliados apresentaram fenômeno de Raynaud. Na literatura observamos uma freqüência de 90 a 98% nos diferentes estudos (BELCH,

1991). Não ocorreu associação estatística significativa entre os graus clínicos de acometimento vascular e formas clínicas da ES, realçando a importância da lesão vascular em todo paciente esclerodérmico, independente da forma clínica, como também observado por SAMPAIO-BARROS (1993).

As manifestações articulares foram presentes em 42,7% dos pacientes estudados, sendo representadas por artrite ou acrosteólise. Ocorreu associação entre estas alterações e a forma difusa da ES. Apesar da elevada incidência das queixas articulares, sua presença não representou maior gravidade no quadro clínico e raramente foram observadas deformidades articulares limitantes. Estes achados correspondem aos encontrados na literatura onde a incidência de artrite variou de 20,6 à 45% (LALLY et al., 1988; FERNANDES et al., 1988; SAMPAIO-BARROS, 1993), o comportamento erosivo foi menos acentuado (FERNANDES et al., 1988) e a associação com ES difusa foi característica (SAMPALIO-BARROS, 1993).

Nos artigos analisados observamos que o envolvimento muscular devido à ES tem sido de pouca expressão (MEDSGER Jr., 1989; MITCHELL et al., 1997). Da mesma forma comportaram-se os pacientes deste trabalho, onde a incidência desta manifestação foi baixa, não apresentando correlação com a forma clínica da ES.

Das manifestações viscerais observadas nos pacientes com ES, o envolvimento esofágico foi o mais freqüente, sem diferença quanto a forma clínica da doença. Estes resultados são compatíveis com os dados da literatura (SILVER, 1991; SJOGREN, 1996; YOUNG et al., 1996; MITCHELL et al., 1997). Todavia, o envolvimento intestinal que ocorreu em pequena freqüência (9,5%), apresentou correlação com a forma limitada da ES. Em revisão realizada por YOUNG et al. (1996), a incidência variou de 10 a 50%. Porém, não foi encontrada na literatura correlação com a forma clínica (SJOGREN, 1996).

O envolvimento pulmonar mostrou-se em segundo lugar de freqüência dentre as manifestações viscerais. A queixa de dispnéia aos esforços ocorreu em 33,4% dos pacientes. A principal manifestação pulmonar na ES foi a doença pulmonar restritiva (DPR) com ocorrência em 28,6% dos pacientes. A hipertensão pulmonar (HP) foi outra manifestação, ocorrendo em 4,8% dos pacientes. Não foi observado diferença estatística significativa entre estas manifestações e forma clínica, sendo estes achados similares aos da maioria dos autores (SAMPALIO-BARROS, 1993; WIGLEY, 1996;

MITCHELL et al., 1997). Para SILVER (1991), a HP ocorreu em 5% dos pacientes com ES limitada e raramente na forma difusa.

As manifestações cardíacas apresentaram uma incidência de 31% nos pacientes em estudo, sem associação com a forma clínica da ES. Estes achados equívalem aos encontrados em trabalhos anteriores (SILVER, 1991; SAMPAIO-BARROS, 1993; DESWAL et al., 1996; BYERS, 1997).

Foram observadas alterações renais em 11,9% dos pacientes estudados, na literatura a incidência variou de 15 a 45% (SAMPALIO-BARROS, 1993; MITCHELL et al., 1997). É importante destacar neste estudo a associação estatística significativa entre a forma difusa da ES e a presença de alterações renais. Esta associação também foi encontrada na literatura (SAMPALIO-BARROS, 1993; STEEN, 1996; MITCHELL et al., 1997).

Alterações neurológicas decorrentes da ES não foram observadas no presente estudo. O envolvimento neurológico na ES é pouco freqüente, podendo ocorrer nas duas formas clínicas, tanto no início da doença quanto como manifestação tardia, em pacientes com ES de longa duração (CERINIC et al., 1996).

### **6.3 AUTO-ANTICORPOS**

A pesquisa de anticorpo antinuclear (ANA) mostrou uma positividade de 78,6%, sem predomínio de um padrão específico. À exceção do padrão centromérico característico do anticorpo anticentrômero (ACA) e da ES limitada, os demais padrões mostraram-se positivos nas duas formas clínicas da ES. Estes achados assemelham-se às grandes séries da literatura (CATOGGIO et al., 1983; GIORDANO et al., 1986; STEEN et al., 1988; BRUNS et al., 1994; SAMPAIO-BARROS et al., 1995).

O anti-Scl-70 foi positivo em 26,2% dos pacientes avaliados, em outros estudos foi observada uma freqüência de 8 a 56% (CATOGGIO et al., 1983; SAMPAIO-BARROS et al., 1995; SPENCER-GREEN et al., 1997). Este anticorpo ocorreu apenas nos pacientes com ES difusa, sendo uma associação significativa estatisticamente e similar aos relatos de vários autores, onde subgrupos sorológicos caracterizam distintos padrões clínicos (BRUNS et al., 1994; SPENCER-GREEN et al., 1997;

HARVEY; McHUGH, 1999). Embora, o anti-Scl-70 tenha sido considerado inicialmente como marcador da forma difusa, ele pode ser encontrado em pacientes com a forma limitada (REIMER, 1990). Não foi observada neste estudo, presença de anti-Scl-70 e ACA em um mesmo paciente, reforçando a hipótese que os dois auto-anticorpos representam diferentes espectros da ES (STEEN et al., 1988).

A presença de ACA apenas nos pacientes com ES limitada confirmou a alta especificidade para esta forma clínica, o que também foi referido na literatura (CATOGGIO et al., 1983; BRUNS et al., 1994; SPENCER-GREEN, 1997; HARVEY & McHUGH, 1999).

A não ocorrência de anti-Sm e anti-La provavelmente é devida à inclusão no estudo somente de pacientes com ES sem doença associada. O achado de anticorpo anti-Ro em 12 pacientes não apresentou correlação com forma clínica. O seguimento destes pacientes merece cuidado, pela descrição de rápida progressão do espessamento cutâneo e mau prognóstico visceral nestes pacientes (PARODI et al., 1991). O anticorpo anti-RNP só esteve presente em um paciente e os achados descritos na literatura sobre sua ocorrência também são pequenos, cerca de 4% dos pacientes (OKANO, 1996).

#### **6.4 CAPILAROSCOPIA PERIUNGUEAL**

Analisando os padrões da CPU e correlacionando com as formas clínicas da ES, foi observado relação entre padrão esclerodérmico e forma difusa da ES, assim como, padrão normal e ES forma limitada. O padrão indiferenciado não apresentou associação estatística significativa. Na literatura está bem estabelecida a associação de ES nas formas difusa e limitada com o padrão esclerodérmico (TER-BORG et al., 1994; OHTSUKA et al., 1997).

## 6.5 SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS

Os antígenos de superfície que caracterizam a linhagem linfóide T, CD2+ (linfócito pan -T), CD3+ (linfócito pan -T), CD3+CD4+ (linfócito T auxiliador/indutor) e CD3+CD8+ (linfócito T supressor/citotóxico) nos pacientes com ES, quando comparados ao grupo controle, apresentaram valores percentuais normais. Da mesma forma comportou-se a razão CD4+/CD8+. Na literatura há grande diversidade entre os resultados de vários autores. Em revisão feita por WHITE (1996), observou-se oscilação nos valores de CD4+ que podem estar normais, aumentados ou diminuídos, assim como os valores de CD8+ que podem estar normais ou diminuídos. Os achados do presente trabalho são similares aos de BRUNS et al. (1994), que não observaram diferença estatística significativa para os antígenos CD3+, CD4+ e CD8+, porém, relataram diminuição de CD2+ nos pacientes com ES quando comparados aos controles. Para FRIERI et al. (1991), os valores de CD3+ e CD8+ estavam diminuídos, mas o CD4+ e a relação CD4+/CD8+ estavam aumentados. Nos relatos de WHITESIDE et al. (1983), UMEHARA et al. (1988), POSTLETHWAITE (1990), GUSTAFSSON et al. (1990) e DAU & CALLAHAN (1994), os pacientes com ES apresentaram aumento na razão CD4+/CD8+ em relação aos controles, sugerindo que a redução do número de células CD8+ possa ser devida também à diminuição do número de linfócitos NK, pois estas células da mesma forma apresentam o antígeno CD8+ em sua superfície. Uma explicação para esta diversidade de achados pode ser a diferença na própria seleção dos pacientes, quanto ao estágio, forma clínica, duração e tratamento da doença, o que torna difícil avaliar o envolvimento celular imune de forma comparativa nos diferentes trabalhos.

Quando foram correlacionadas estas subpopulações que caracterizam a linhagem de linfócitos T com as formas clínicas e tempo de doença de pacientes com ES, foi observado neste trabalho, aumento estatisticamente significativo dos linfócitos T CD3+CD4+ nos pacientes com ES limitada e nos pacientes com ES de longa duração. Não foi encontrada esta correlação específica nos dados da literatura.

A maioria dos linfócitos T maduros expressam em sua membrana o TCR $\alpha/\beta$  que está associado ao complexo CD3 e aproximadamente 5% dos linfócitos T expressam o TCR $\gamma/\delta$ . Estes linfócitos T expressando o TCR $\gamma/\delta$ , agem na homeostase da resposta

imune e parecem estar envolvidos em várias condições como as imunodeficiências, infecções e doenças autoimunes (GERLI et al., 1991; GIACOMELLI et al., 1998). Também parecem exercer função reguladora nos tecidos durante a resposta imune, sendo encontrado deposição destas células nas áreas perivasculares nos estágios iniciais da ES e em menor grau, nas fases escleróticas crônicas. Foi sugerido que estes linfócitos T CD3+TCR $\gamma$ / $\delta$ + possam estar envolvidos na patogênese da lesão cutânea e de outros órgãos na ES, tanto no início como na perpetuação da doença (GIACOMELLI et al., 1998).

Os achados de diminuição dos linfócitos T CD3+TCR $\gamma$ / $\delta$ +, neste trabalho concordam com os de HOLCOMBE et al. (1995) e WHITE (1996), os quais sugerem que este subtipo de linfócito T pode desempenhar papel na ES. Provavelmente a redução dos linfócitos T CD3+TCR $\gamma$ / $\delta$ + na circulação seja devida ao recrutamento destes linfócitos nos tecidos dos pacientes para a manutenção do processo de atividade da doença, pois os mesmos estão relacionados ao controle da resposta imune. GERLI et al. (1991) e GIACOMELLI et al. (1998), descreveram níveis discretamente elevados para estes linfócitos nos pacientes com ES quando comparados com os controles, porém, não observaram diferença estatisticamente significativa.

Na avaliação dos parâmetros clínicos deste estudo, foi observado uma diminuição estatisticamente significativa dos linfócitos T CD3+TCR $\gamma$ / $\delta$ + nos pacientes portadores de ES difusa, de longa duração, com envolvimento pulmonar caracterizado por DPR, envolvimento muscular e presença de anticorpo anti-Scl-70. Esta população pode ser considerada como um grupo especial de pacientes com manifestações imunes semelhantes, pois é bem fundamentada na literatura que a ES difusa tem relação com a presença de anticorpo anti-Scl-70 e com o envolvimento pulmonar (MITCHELL et al., 1997). Este achado pode sugerir que os linfócitos T CD3+TCR $\gamma$ / $\delta$ + neste grupo de pacientes possam estar envolvidos na perpetuação da lesão na ES. HOLCOMBE et al. (1995) também encontraram diminuição mais evidente dos linfócitos T CD3+TCR $\gamma$ / $\delta$ + nos pacientes com ES difusa e presença de anticorpo anti-Scl-70, porém encontraram maior frequência desta alteração nos pacientes com doença recente.



O aparecimento de linfócitos T ativados na circulação é um achado comum nos pacientes com doenças autoimunes. Na ES, como uma destas doenças, a presença de linfócitos T ativados provavelmente implica na continuação das reações imunes dependentes de linfócitos T em todo o corpo. A natureza do processo de ativação na ES é desconhecido, mas o mecanismo de ativação parece estar presente durante os estágios iniciais da doença e persiste com a evolução da mesma (GUSTAFSSON et al., 1990).

As proteínas de adesão na superfície dos linfócitos, também conhecidas como moléculas acessórias, podem ser responsáveis pelas diferentes condições de ativação e função efetora dos linfócitos T CD4+ e CD8+ (FIOCCO et al., 1993). As diferentes expressões de algumas moléculas de ativação nos linfócitos T CD4+ e CD8+ como HLA-DR (receptor do Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II), CD25 (cadeia  $\alpha$  do receptor de interleucina-2), CD71 (receptor da transferrina) e CD45RA (célula T virgem) são utilizadas para avaliar a ativação dos linfócitos T no sangue periférico dos pacientes com ES.

Neste estudo, observou-se aumento estatisticamente significativo dos níveis de linfócitos T CD4+HLA-DR+ e CD8+HLA-DR+ nos pacientes com ES quando comparados ao grupo controle, indicando que os linfócitos T estão ativados nestes pacientes e portanto podem participar no mecanismo da doença. Da mesma forma concluíram GUSTAFSSON et al. (1990), FIOCCO et al. (1993), DAU & CALLAHAN (1994) e WHITE (1996).

As moléculas de ativação HLA-DR foram mais freqüentes nos linfócitos T CD8+ em relação aos linfócitos T CD4+, o que poderia indicar que estes linfócitos T CD8+ têm maior relação com os marcadores de ativação tardia (HLA-DR). Este achado foi relatado em portadores de artrite reativa (BEACOCK-SHAPP et al., 1998), porém, não foram encontradas referências desta observação em pacientes com ES.

Algumas particularidades foram encontradas nos pacientes em estudo quando avaliadas as moléculas de ativação HLA-DR nos linfócitos T CD4+ e CD8+, com relação à forma clínica, duração da doença e presença de auto-anticorpos.

Os linfócitos T CD4+HLA-DR+ e CD8+HLA-DR+ apresentaram aumento estatístico significativo na forma clínica difusa, estando normais nos pacientes com ES limitada. É provável que esta alteração sugira maior atividade da doença na forma

difusa que na limitada, pois esta última, possui um curso mais arrastado e menos agressivo (MITCHELL et al., 1997). Não foram encontrados relatos específicos do comportamento destas células com relação à forma clínica da ES.

Nos pacientes com menos de três anos de doença foi observado aumento significativo do número de células T CD8+HLA-DR+ e aumento não significativo de células T CD4+HLA-DR+. Nos pacientes com doença de longa duração ambas as células T CD4+HLA-DR+ e CD8+HLA-DR+ mostraram-se em níveis aumentados. GUSTAFSSON et al. (1990) notaram aumento de células T CD4+HLA-DR+ e CD8+HLA-DR+ mais acentuado nos pacientes com doença recente comparados aos com doença tardia, enquanto que nos pacientes deste estudo, não houve diferença estatística significativa entre a doença recente e tardia, apesar de ocorrer aumento dos níveis de HLA-DR em ambas as fases da doença. A observação da expressão HLA-DR nos linfócitos T circulantes de pacientes com doença prolongada indica que a ativação não está presente apenas como um evento inicial transitório, mas é mantida através de todos os estágios da doença, como também demonstrado por GUSTAFSSON et al. (1990).

Nos pacientes portadores de ES com anticorpo anticentrômero presente, observou-se diminuição estatisticamente significativa de células T CD4+HLA-DR+, o que pode estar relacionado à atividade geralmente mais branda da doença em presença deste anticorpo, que é característico da forma limitada da doença, uma forma quase sempre menos agressiva (MITCHELL et al., 1997). Não encontrou-se na literatura trabalhos com relatos desta alteração, porém o número encontrado de pacientes foi pequeno para maiores considerações.

As moléculas de ativação CD25 e CD71 não se apresentaram alteradas nos linfócitos T CD4+ e CD8+ dos pacientes com ES, quando comparados ao grupo controle, diferindo dos achados de aumento nestes marcadores de ativação relatado por BRUNS et al. (1994) e aumento de CD25 relatado por DAU & CALLAHAN (1994) e WHITE (1996).

A expressão da isoforma CD45RA do CD45, que representa os linfócitos T virgens, ou seja, aqueles que nunca encontraram antígeno, foi avaliada nos linfócitos T CD4+ e CD8+. Observou-se níveis normais de linfócitos T CD4+CD45RA+ e CD8+CD45RA+ nos pacientes com ES quando comparados ao grupo controle. No

estudo de KAHAN et al. (1991), também não ocorreu variação de linfócitos T CD4+CD45RA+ com relação ao grupo controle, contudo, os valores para a subpopulação de linfócitos T CD8+CD45RA+ foram significativamente maiores no grupo com ES. Para FIOCCO et al. (1993), os pacientes com ES também não apresentaram variação quanto ao número de linfócitos T CD4+CD45RA+, o que não ocorreu com as observações de GUSTAFSSON et al. (1990) e de FRIERI et al. (1991), que referem redução do número de linfócitos T CD4+CD45RA+. Estes autores sugerem que os linfócitos T CD4+CD45RA+ têm um papel importante na ativação dos linfócitos T CD8+ supressores, podendo levar à supressão da síntese de imunoglobulinas pelos linfócitos B e que talvez, a diminuição dos linfócitos T CD4+CD45RA+ esteja implicada também na função dos linfócitos NK.

Ao avaliar os níveis de linfócitos T CD4+CD45RA+ e o tempo de doença observou-se na fase inicial da ES diminuição não estatisticamente significativa destes níveis, porém, nos pacientes com doença de longa duração ocorreu aumento estatisticamente significativo dos mesmos. Estes achados são semelhantes aos de FRIERI et al. (1991), e podem indicar a ocorrência de um defeito na imunorregulação nos pacientes com ES, já que estas células são linfócitos indutores da supressão.

Os linfócitos B, avaliados através da pesquisa de CD19+, apresentaram diminuição nos valores percentuais no grupo dos pacientes quando comparados ao grupo controle. Para DAU & CALLAHAN (1994), estes linfócitos estavam normais e apenas sofreram redução após o uso de terapia combinada (plasmaferese, ciclofosfamida e prednisona) que pode levar à diminuição da resposta imune.

Ao avaliar-se, neste estudo a relação dos linfócitos B com as formas clínicas e o tempo de doença, observou-se uma diminuição estatística significativa dos linfócitos B nos pacientes com ES limitada e naqueles com doença recente, como também, foi observado diminuição não significativa estatisticamente nestes linfócitos nos pacientes com ES difusa e naqueles com doença tardia. Estes achados foram parcialmente semelhantes às observações de FRIERI et al. (1991), que encontraram diminuição dos linfócitos B CD19+ nos pacientes com doença de longa duração não importando a forma clínica, apesar de referirem que os resultados não foram estatisticamente significativos pelo pequeno número de pacientes analisados.

Outra subpopulação de linfócitos analisada foram os linfócitos NK, que se apresentaram em números percentuais diminuídos quando avaliados pelo CD56+ nos pacientes com ES em relação ao grupo controle, como também relatado por FRIERI et al.(1991). Nos trabalhos de KANTOR et al. (1992), DAU & CALLAHAN (1994) e HOLCOMBE et al. (1995), não houve relato de variação quanto ao número de linfócitos NK. Para FAMULARO et al. (1992), ocorreu aumento do número de linfócitos NK CD56+, sugerindo que estes linfócitos participariam na modulação da função dos linfócitos B, diversamente do que fazem os linfócitos NK CD16+. Foram encontradas publicações anteriores com resultados conflitantes, que não deixam claro se os pacientes com ES têm atividade normal ou comprometida dos linfócitos NK (WRIGHT et al., 1982; MILLER et al., 1988). Estas variações entre os resultados podem ser devidas aos diferentes anticorpos utilizados na identificação da população de linfócitos com atividade NK (FRIERI et al., 1991; HOLCOMBE et al., 1995).

Avaliando a forma clínica da ES e o comportamento dos linfócitos NK CD56+, observou-se diminuição destes nos pacientes com ES difusa, concordando com os achados de MILLER et al. (1988), FRIERI et al. (1991) e HOLCOMBE et al. (1995). Na forma limitada não ocorreu variação, porém, para HOLCOMBE et al. (1995) ocorreu aumento de linfócitos NK CD56+. Quanto a duração da doença, os linfócitos NK apresentaram-se diminuídos nos pacientes com doença prolongada e normais nos pacientes com doença recente. Estes dados diferem do aumento dos linfócitos NK encontrados por HOLCOMBE et al. (1995), nos pacientes com doença de longa duração. Pode-se sugerir que a proporção dos linfócitos NK no sangue periférico dos pacientes com ES depende das características do grupo em estudo e do anticorpo monoclonal utilizado para definir a população de linfócitos NK. A diminuição do número destes linfócitos nos pacientes com ES difusa e com doença de longa duração, pode refletir um subgrupo específico da doença ou então um defeito não definido na função dos mesmos.

Em uma análise global das subpopulações linfocitárias na ES foi possível concluir que estes dados fornecem indicações importantes para sugerir que a imunidade mediada por células esteja envolvida no processo de desencadeamento e manutenção da ES. Tais evidências são a presença de ativação dos linfócitos T,

através dos marcadores HLA-DR e CD45RA+, e a redução dos linfócitos T CD3+TCR $\gamma$ / $\delta$ +, dos linfócitos B e dos linfócitos NK.

O achado de um subgrupo particular formado por pacientes com ES difusa, de longa duração, com envolvimento pulmonar (DPR) e muscular e presença de anticorpo anti-Scl-70, relacionados à redução dos linfócitos T CD3+TCR $\gamma$ / $\delta$ +, pode sugerir que a avaliação das subpopulações linfocitárias possa servir como marcador para o prognóstico destes pacientes. Para verificar estas suspeitas seria de valia realizar acompanhamento destes subgrupos. A Esclerose Sistêmica, como doença grave e estigmatizante, de tratamento restrito e pouco eficaz, merece todas as investigações que possam tornar precoce o seu diagnóstico e que estabeleçam seus fatores prognósticos, possibilitando a tentativa de interferir na evolução clínica da mesma.

## **7 CONCLUSÕES**

## 7 CONCLUSÕES

- 1- Demonstrou-se o aumento das moléculas de ativação HLA-DR nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e a diminuição dos linfócitos T CD3<sup>+</sup>TCR $\gamma/\delta$ <sup>+</sup>, dos linfócitos B CD19<sup>+</sup> e dos linfócitos NK CD56<sup>+</sup>, permitindo a diferenciação entre portadores de ES e controles.
- 2- Na ES forma difusa encontrou-se redução do número dos linfócitos T CD3<sup>+</sup>TCR $\gamma/\delta$ <sup>+</sup> e dos linfócitos NK CD56<sup>+</sup> e na forma limitada, a redução dos linfócitos B CD19<sup>+</sup>.
- 3- No estágio inicial da ES foi encontrado redução dos linfócitos B CD19<sup>+</sup> e no estágio tardio redução dos linfócitos T CD3<sup>+</sup>TCR $\gamma/\delta$ <sup>+</sup> e dos linfócitos NK CD56<sup>+</sup>.
- 4- Demonstrou-se interação entre a redução dos linfócitos T CD3<sup>+</sup>TCR $\gamma/\delta$ <sup>+</sup> e a presença de envolvimento pulmonar e muscular.
- 5- A presença de anticorpo anti-Scl-70 nos portadores de ES relacionou-se à diminuição dos linfócitos T CD3<sup>+</sup>TCR $\gamma/\delta$ <sup>+</sup>. A presença de anticorpo anticentrômero relacionou-se à diminuição dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> nos pacientes com ES.

**ANEXOS**



## BANCO DE DADOS PACIENTES COM ES

NOME	SEXO	IDADE	RAÇA	IID	TD	FC	CUTANEO		ARTICULAR	VASCULAR	MUSCULAR	GASTRO	
							CAL	TEL				ESO	INT
1	F	34	B	29	5	D	N	P	P	P	N	P	N
2	F	34	Ng	32	2	L	N	N	P	N	N	P	N
3	F	47	B	44	3	D	N	P	P	N	N	P	N
4	F	36	B	33	3	L	N	P	N	N	N	N	P
5	F	55	B	25	30	L	N	P	N	P	N	P	N
6	F	33	B	31	2	L	N	P	N	N	N	N	P
7	F	46	B	36	10	L	N	P	N	P	N	P	N
8	M	15	B	14	1	L	N	N	N	N	N	N	N
9	F	39	B	27	12	D	N	P	P	N	N	P	N
10	F	34	B	32	2	L	N	P	N	N	N	P	N
11	F	40	B	30	10	D	N	P	P	N	N	P	N
12	F	33	B	31	2	L	N	P	N	N	N	P	N
13	F	58	B	52	6	D	N	P	N	P	N	P	N
14	F	48	B	45	2	L	N	N	N	N	N	P	N
15	F	56	B	50	6	D	N	P	N	P	N	P	N
16	F	49	B	47	2	L	N	N	N	N	N	P	N
17	F	44	B	39	5	D	N	N	N	N	N	P	N
18	F	44	B	41	3	D	N	P	P	P	N	P	N
19	F	50	B	44	6	L	N	P	N	P	N	N	P
20	F	45	B	43	2	D	N	N	N	N	N	P	N
21	F	43	B	40	3	L	N	P	N	P	N	P	N
22	F	51	B	45	6	L	N	P	N	P	N	N	P
23	F	52	B	47	5	L	N	P	N	N	N	P	N
24	F	31	B	11	20	D	N	N	P	P	N	N	N
25	F	36	B	38	8	D	N	P	P	P	N	P	N
26	M	50	B	45	5	L	N	P	N	N	N	P	N
27	M	33	B	24	9	D	N	N	P	P	N	N	N
28	F	45	B	38	7	D	N	P	P	P	N	P	N
29	F	45	B	37	8	D	N	P	N	P	N	P	N
30	F	39	B	34	5	L	N	N	P	N	N	P	N
31	F	46	Ng	38	8	D	N	P	N	P	N	P	N
32	F	40	Ng	36	8	L	N	P	P	N	N	P	N
33	F	42	B	38	4	D	N	N	P	N	P	P	N
34	F	43	B	39	4	D	N	N	P	N	P	P	N
35	F	54	Ng	45	9	L	N	P	N	P	N	N	N
36	F	53	B	43	10	D	N	P	P	P	N	P	N
37	F	50	B	48	2	D	N	N	N	N	N	P	N
38	M	31	B	30	1	D	N	N	N	P	N	P	N
39	F	32	B	31	1	D	N	N	N	P	N	P	N
40	F	57	B	53	4	D	N	N	P	P	N	P	N
41	F	56	B	54	2	D	N	N	P	P	N	P	N
42	F	51	B	37	14	L	N	P	P	P	N	P	N

## BANCO DE DADOS PACIENTES COM ES - CONTINUAÇÃO

PULMONAR		CARDIACO	RENAL	CPU			ANA	Anti-Scf-70	ACA	Anti-Ro	Anti-La	Anti-RNP	Anti-Sm
DPR	HP			SD	NO	IND							
N	N	N	N	P	N	N	SALPICADO	N	N	N	N	N	N
N	N	N	N	N	P	N	HOMOGÊNEO	N	N	N	N	N	N
S	N	N	N	P	N	N	HOMO+NUCLEAR	P	N	N	N	N	N
N	N	N	N	P	N	N	CENTRÔMERO	N	P	N	N	P	N
N	N	N	N	P	N	N	CENTRÔMERO	N	P	N	N	N	N
N	N	N	N	P	N	N	CENTRÔMERO	N	P	N	N	N	N
N	N	P	N	P	N	N	SALPICADO	N	N	P	N	N	N
N	N	N	N	N	P	N	NEGATIVO	N	N	P	N	N	N
N	N	N	P	N	N	P	SALPICADO	P	N	P	N	N	N
S	N	N	N	P	N	N	SALPICADO	N	N	P	N	N	N
N	N	N	N	N	N	P	SALPICADO	N	N	P	N	N	N
S	N	N	N	P	N	N	HOMOGÊNEO	N	N	P	N	N	N
S	N	P	N	P	N	N	HOMO+SALP.	P	N	P	N	N	N
N	S	P	N	N	P	N	NEGATIVO	N	N	P	N	N	N
S	N	P	N	P	N	N	HOMO+SALP.	P	N	P	N	N	N
N	S	P	N	N	P	N	NEGATIVO	N	N	P	N	N	N
N	N	P	N	N	N	P	SALPICADO	N	N	P	N	N	N
N	N	P	N	P	N	N	SALPICADO	N	N	N	N	N	N
N	N	N	N	P	N	N	CENTRÔMERO	N	P	N	N	N	N
N	N	P	N	P	N	N	SALPICADO	N	N	N	N	N	N
N	N	N	N	P	N	N	CENTRÔMERO	N	P	N	N	N	N
N	N	N	N	N	P	N	CENTRÔMERO	N	P	N	N	N	N
N	N	N	N	N	P	N	NEGATIVO	N	N	N	N	N	N
N	N	N	N	P	N	N	NEGATIVO	N	N	N	N	N	N
N	N	P	P	P	N	N	HOMO+SALP.	P	N	N	N	N	N
N	N	N	N	N	P	N	NEGATIVO	N	N	N	N	N	N
N	N	N	N	N	P	N	NEGATIVO	N	N	N	N	N	N
N	N	P	N	P	N	N	HOMO+SALP.	P	N	N	N	N	N
N	N	N	N	P	N	N	NUCLEOLAR	P	N	N	N	N	N
N	N	N	N	N	P	N	NEGATIVO	N	N	N	N	N	N
N	N	N	N	P	N	N	NUCLEOLAR	P	N	N	N	N	N
N	N	N	N	N	P	N	NEGATIVO	N	N	N	N	N	N
S	N	N	N	P	N	N	SALP.+ NUCLEOLAR	N	N	N	N	N	N
S	N	N	N	P	N	N	SALP.+ NUCLEOLAR	N	N	N	N	N	N
S	N	N	N	P	N	N	NUCLEOLAR	N	N	N	N	N	N
S	N	P	P	P	N	N	NUCLEOLAR	P	N	P	N	N	N
N	N	N	N	P	N	N	HOMOGÊNEO	N	N	N	N	N	N
S	N	P	P	P	N	N	NUCLEOLAR	P	N	N	N	N	N
S	N	N	P	P	N	N	NUCLEOLAR	P	N	N	N	N	N
N	N	N	N	P	N	N	NUCLEOLAR	N	N	N	N	N	N
N	N	N	N	P	N	N	NUCLEOLAR	N	N	N	N	N	N
S	N	P	N	P	N	N	HOMO+ NUCLEOLAR	N	N	N	N	N	N

F – Feminino M – Masculino B – Branco Ng – Negro D – Difuso L – Limitado P – Positivo N – Negativo

### GRUPO CONTROLE

NOME	SEXO	IDADE	RAÇA
50	F	42	B
51	F	43	B
52	F	28	B
53	F	41	B
54	F	42	N
55	F	33	B
56	F	36	B
57	F	40	B
58	F	47	B
59	F	39	B
60	F	36	B
61	F	28	B
62	F	30	B
63	M	28	B
64	M	37	B
65	M	30	B
66	F	50	B
67	F	36	B
68	F	45	B
69	F	37	B
70	F	30	B
71	M	27	B
72	M	36	B
73	M	27	B
74	M	34	B
75	F	44	N
76	F	37	N
77	M	53	B

F – Feminino M – Masculino B – Branco N – Negro

### PORCENTAGENS DO NÚMERO DE LEUCÓCITOS NA ES

Paciente	nºleucócitos	%linfócitos	nºlinfócitos	CD3+	CD3+ CD4+	CD3+CD8+	CD3+CD4+ CD8+	CD3+CD4- CD8-	CD45RA+	CD4+ CD45RA+
1	7900	15,8	1248	11,8	6,8	44,4	0,02	0,5	15,0	6,8
2	7000	16,7	1169	11,2	4,5	5,2	0,01	0,4	15,8	4,5
3	8300	42,5	3528	23,4	14,7	8,4	0,03	0,7	39,7	14,7
4	12200	19,6	2391	14,3	9,2	3,0	0,03	1,7	17,6	9,2
5	5100	28,1	1433	20,3	13,8	5,2	0,01	0,8	27,1	13,8
6	12000	20,3	2436	14,8	9,3	2,8	0,02	1,9	18,5	9,3
7	5300	30,3	1590	21,9	14,3	6,0	0,01	1,2	29,0	14,3
8	6000	28,4	1704	15,2	9,3	4,2	0,02	1,0	27,0	9,3
9	4100	25,4	1041	22,2	9,8	11,2	0,03	0,4	24,6	9,8
10	8500	24,0	2040	15,8	10,9	4,2	0,02	0,4	23,2	10,9
11	4100	23,1	947	19,8	8,8	10,5	0,04	0,3	22,4	8,8
12	7900	24,1	1904	15,5	10,6	4,2	0,04	0,3	23,1	10,6
13	8100	19,5	1580	4,4	9,1	4,6	0,01	0,2	18,9	9,1
14	8600	17,3	1488	12,3	10,4	1,3	0,01	0,2	16,8	10,4
15	8600	17,6	1514	12,9	10,8	1,3	0,01	0,2	16,9	10,8
16	8400	20,0	1680	15,3	9,7	4,6	0,06	0,2	18,2	9,7
17	8300	18,6	1644	8,7	4,9	3,0	0,05	0,5	17,0	4,9
18	5200	33,8	1758	25,5	13,9	9,6	0,09	0,5	31,8	13,9
19	6800	30,8	2094	24,8	16,3	7,7	0,03	0,5	28,7	16,3
20	7900	18,6	1469	9,3	5,0	3,3	0,03	0,6	16,5	5,0
21	5100	34,3	1749	26,1	14,4	10,2	0,08	0,3	32,9	14,4
22	6700	31,7	2124	25,5	16,6	8,4	0,06	0,5	30,7	16,6
23	4100	34,9	1431	25,3	15,7	7,3	0,06	1,4	32,3	15,7
24	4700	41,7	1960	31,8	22,0	8,7	0,04	0,7	39,4	22,0
25	10700	26,6	2846	17,4	10,5	5,5	0,01	0,7	25,2	10,5
26	4100	36,0	1476	26,1	16,0	7,6	0,02	1,4	33,9	16,0
27	4500	43,3	1949	32,9	22,8	8,5	0,02	0,8	41,2	22,8
28	5000	28,8	1440	18,4	11,0	5,6	0,01	0,9	26,7	11,0
29	7400	29,6	2190	20,5	11,2	8,5	0,10	0,2	28,2	11,2
30	5900	31,5	1859	20,6	14,4	5,6	0,05	0,4	30,0	14,4
31	7500	29,4	22,5	22,6	11,9	10,2	0,07	0,2	27,8	11,9
32	5900	31,2	1841	21,6	14,9	6,2	0,05	0,7	29,1	14,5
33	14400	20,3	2923	12	14,5	3,3	0,01	0,05	19,7	8,5
34	13200	18,9	2495	11,5	8,5	3,3	0,03	0,1	16,9	8,0
35	12600	18,0	2268	12,3	8	2,4	0,03	0,1	17,3	9,6
36	4600	35,0	1610	24,1	9,6	3,9	0,06	0,6	34,0	19,1
37	8600	19,6	1686	12,3	19,1	3,6	0,10	0,2	18,9	7,9
38	11700	38,0	4446	29,9	7,9	11,8	0,08	0,6	37,1	17,3
39	11100	38,5	4274	29	17,3	11,8	0,01	0,6	37,4	16,3
40	6600	28,4	1874	21,2	16,3	5,4	0,40	0,5	29,3	14,4
41	6700	28,4	1903	21,3	14,4	5,4	0,20	0,5	26,2	14,4
42	6900	27,6	1904	20,6	14,5	5	0,01	0,8	26,0	14,5

# PORCENTAGENS DO NÚMERO DE LEUCÓCITOS NA ES - CONTINUAÇÃO

CD8+ CD45RA+	CD25+	CD4+ CD25+	CD8+CD25+	CD4+ HLA-DR+	CD8+ HLA-DR+	CD3+TCR Alfa/Beta	CD3+TCR Gama/ Delta	CD2+	CD71+	CD19+	CD56+
4,4	0,3	0,3	0	0,2	1,5	11,4	0,4	13,0	4,6	1,0	0,8
5,2	0,4	0,4	0	0,2	1,2	9,7	1,5	11,9	5,9	1,3	2,2
8,4	0,6	0,6	0	0,3	1,0	22,9	0,5	37,5	8,8	3,3	10,5
3,0	0,2	0,2	0	0,5	0,4	13,5	1,8	16,3	3,6	0,7	1,6
5,2	0,4	0,4	0	0,8	0,7	19,3	1,0	21,9	5,7	2,0	2,3
2,8	0,3	0,3	0	0,3	0,2	12,7	2,1	16,0	2,9	0,8	1,5
6,0	0,4	0,3	0	0,8	0,8	20,9	1,0	23,8	6,4	2,6	2,2
4,2	0,6	0,6	0	0,3	0,06	14,4	0,8	18,9	4,7	4,0	4,3
11,2	0,4	0,4	0	2,4	2,3	21,7	0,5	22,8	11,6	0,6	1,3
4,2	0,5	0,5	0	0,9	0,5	15,6	0,2	17,5	4,6	3,3	2,2
10,5	0,2	0,2	0	2,5	2,5	19,6	0,2	21,3	10,8	0,6	0,9
4,2	0,3	0,3	0	1,0	0,9	15,2	0,3	17,5	4,9	3,3	1,3
4,6	0,6	0,5	0	0,5	0,4	14,0	0,4	15,2	4,9	1,6	1,3
1,3	0,3	0,3	0	0,4	0,1	12,0	0,3	13,5	1,5	1,1	1,6
1,3	0,3	0,3	0	0,5	0,2	12,4	0,5	14,6	1,5	1,2	1,6
4,6	0,3	0,2	0	0,6	0,6	14,8	0,5	16,3	5,1	1,6	0,4
3,0	0,2	0,2	0	0,5	0,3	7,9	0,8	14,0	4,0	0,7	1,6
9,6	0,5	0,5	0	0,8	1,3	25,2	0,3	27,2	10,3	1,0	2,5
7,7	0,4	0,4	0	0,7	2,0	24,4	0,4	26,3	8,0	2,4	0,5
3,3	0,3	0,3	0	0,7	0,5	8,6	0,7	13,6	4,5	0,9	1,6
10,1	0,4	0,4	0	0,7	1,7	25,9	0,2	29,5	10,5	1,3	2,1
8,4	0,4	0,3	0	0,7	2,7	25,1	0,4	27,0	9,4	2,5	0,6
7,3	0,4	0,4	0	1,0	1,4	23,8	1,5	27,7	7,5	2,4	0,7
8,7	0,6	0,6	0	2,0	0,6	31,0	0,8	36,1	8,7	1,9	1,2
5,5	0,8	0,7	0	1,0	0,5	16,5	0,9	19,5	6,0	3,3	0,1
7,6	0,8	0,7	0	1,1	1,5	24,7	1,4	27,9	7,9	3,0	0,5
8,5	0,4	0,4	0	2,1	0,7	32,1	0,8	37,3	8,7	2,2	0,4
5,6	0,5	0,3	0	0,8	0,6	17,3	1,1	19,8	6,0	3,7	0,08
8,5	0,5	0,4	0	1,1	2,9	20,2	0,3	22,9	8,7	1,7	0,02
5,6	0,9	0,9	0	0,5	0,2	20,1	0,5	22,4	6,0	3,0	0,7
10,4	0,4	0,3	0	1,1	3,3	22,4	0,2	23,5	10,8	1,8	0,09
6,2	0,8	0,6	0	0,5	0,3	21,1	0,5	22,5	6,5	3,2	0,8
3,3	1,0	0,9	0	0,9	0,9	12,0	0,03	13,9	3,7	3,2	0,2
3,3	0,6	0,6	0	0,8	1,0	11,4	0,08	13,5	3,5	3,8	0,3
2,4	0,3	0,3	0	0,6	0,3	12,2	0,1	13,4	2,5	3,6	0,8
3,9	0,9	0,8	0	1,2	0,7	23,7	0,4	26,9	4,1	4,5	1,3
3,6	0,7	0,7	0	1,6	1,3	12,0	0,3	12,9	3,8	5,8	0
11,8	0,2	0,2	0	0,8	2,3	29,2	0,7	33,5	11,9	2,8	3,2
11,8	0,6	0,5	0	1,1	3,5	28,3	0,7	33,9	12,3	3,1	3,7
5,4	0,5	0,5	0	1,1	0,5	20,6	0,6	21,5	5,5	3,5	1,1
5,4	0,5	0,5	0	1,0	0,8	20,8	0,5	20,9	5,6	3,2	1,1
5,0	0,3	0,2	0	0,7	0,8	19,9	0,7	21,8	5,1	2,5	1,5

### PORCENTAGENS DO NÚMERO DE LEUCÓCITOS NO GRUPO CONTROLE

Paciente	n° leucócitos	%linfócitos	n° linfócitos	CD3+	CD3+ CD4+	CD3+CD8+	CD3+CD4+ CD8+	CD3+CD4- CD8-	CD45RA+	CD4+ CD45RA+
50	5100	36,0	1836	26,8	16,9	7,9	0,10	1,5	33,2	16,9
51	5200	35,0	1820	27,9	17,5	8,0	0,03	1,6	31,9	17,5
52	6500	27,4	1781	17,6	11,6	4,6	0,04	0,9	25,5	11,6
53	3900	26,6	1037	20,3	9,1	10,8	0,06	0,2	25,2	9,1
54	5400	29,0	1566	22,7	11,0	9,5	0,04	0,5	27,2	11,0
55	7300	26,0	1898	18,3	11,8	4,6	0,03	0,4	24,2	11,8
56	9300	18,1	1683	11,2	6,5	4,6	0,06	0,2	16,4	6,5
57	4500	32,0	1440	25	10,5	14,0	0,10	0,1	31,2	10,5
58	4000	41,2	1648	30,4	19,2	8,8	0,03	1,2	40,0	19,2
59	3800	29,8	1132	19	12,8	5,0	0,06	0,6	27,4	12,8
60	6100	27,5	1678	16,4	9,0	5,0	0,03	1,5	25,6	9,0
61	8200	30,0	2460	22,5	15,0	6,0	0,03	1,0	28,7	15,0
62	5400	44,6	2408	30	20,3	8,3	0,20	0,9	42,9	20,3
63	7000	25,0	1750	17,7	8,0	8,1	0	1,0	23,7	8,0
64	6000	27,7	1662	20	12,2	7,2	0,01	0,4	26,5	12,2
65	5000	41,5	2075	20,2	15,3	3,7	0,02	0,6	38,9	15,3
66	4600	32,6	1500	22,5	12,6	9,1	0,05	0,4	31,5	12,6
67	8200	28,4	2329	17,7	11,4	4,1	0,06	1,4	25,3	11,4
68	5900	17,9	1056	12	8,4	3,0	0,03	0,3	16,9	8,4
69	11000	24,3	2673	16,5	9,5	5,9	0,10	0,5	21,8	9,5
70	6000	29,1	1746	21,4	12,0	6,8	0,01	1,7	27,4	12,0
71	4200	49,2	2066	33,6	20,6	10,4	0,02	1,7	47,6	20,6
72	6200	26,6	1649	19,9	15,0	3,9	0,02	0,7	25,7	15,0
73	9200	23,7	2180	14,8	10,6	3,7	0,01	0,2	21,4	10,6
74	5900	39,0	2301	27,3	14,5	10,3	0,10	0,7	39,0	14,5
75	4200	42,0	1764	27,2	17,8	5,8	0,01	2,3	39,6	17,8
76	5000	33,1	1655	22,9	13,7	8,1	0,08	0,9	31,4	13,7
77	7400	45,4	3360	27,8	17,0	9,3	0,02	0,7	44,0	17,0

**PORCENTAGENS DO NÚMERO DE LEUCÓCITOS NO GRUPO CONTROLE –  
CONTINUAÇÃO**

<i>CD8+ CD45RA+</i>	<i>CD25+</i>	<i>CD4+ CD25+</i>	<i>CD8+ CD25+</i>	<i>CD4+ HLA-DR+</i>	<i>CD8+ HLA-DR+</i>	<i>CD3+TCR Alfa/Beta</i>	<i>CD3+TCR Gama/Delta</i>	<i>CD2+</i>	<i>CD71+</i>	<i>CD19+</i>	<i>CD56+</i>
7,9	0,6	0,2	0	0,6	0,4	24,9	1,9	29,3	8,1	2,9	0,5
8,0	0,5	0,4	0	0,5	0,5	25,9	2	29,1	8,2	3	0,4
4,6	0,5	0,4	0	0,4	0,2	16,6	1	20,6	4,6	3	1,6
10,8	0,5	0,5	0	0,5	0,7	20	0,3	20,4	10,8	2,6	1
9,5	0,3	0,3	0	0,7	1,2	21	1,7	21,6	9,5	2,3	2
4,6	0,4	0,4	0	0,4	0,5	17	1,4	19,3	5	3,3	1,8
4,6	0,6	0,5	0	0,7	0,5	10,7	0,5	12,9	5	2	1,9
14,0	0,4	0,2	0	0,9	1,1	24,6	0,4	25,6	14	3,3	2,9
8,8	0,6	0,5	0	1,3	0,5	28	2,4	33,1	9	3	4
5,0	0,7	0,6	0	0,6	0,5	18,5	0,5	21,4	5,3	2	1,6
5,0	0,5	0,4	0	0,3	0,3	14,4	2	21	5,6	2,3	3,5
6,0	0,5	0,5	0	0,4	0,4	21,5	1	24	6	3,1	2,2
8,3	0,4	0,3	0	0,7	0,6	29,1	0,9	35,4	8,3	4,1	5,4
8,1	0,3	0,3	0	0,4	0,5	16,4	1,3	21,2	8,1	2,4	2,2
7,2	0,4	0,3	0	1,1	1,1	19,5	0,5	21,6	7,2	2	2,8
3,7	0,5	0,2	0	1,3	0,2	19,6	0,6	27,7	3,8	10,2	4,1
9,1	0,8	0,6	0	1,6	1,5	21,7	0,8	25	9,1	5,1	1,7
4,1	0,5	0,4	0	0,4	0,2	16,2	1,5	21,6	4,2	2,8	2
3,0	0,3	0,3	0	1	0,2	11,7	0,3	14	4,3	1	1,7
5,9	0,5	0,4	0	0,8	0,9	16	0,5	19,1	6	2,5	3,1
6,8	0,6	0,5	0	0,6	0,6	19,1	2,3	21,7	6,9	2,8	1,1
10,4	0,9	0,7	0	0,6	0,6	31,6	2	37,2	10,9	7,1	1,2
3,9	0,6	0,5	0	1,3	0,2	19	0,9	22,2	4,1	1,7	2
3,7	0,4	0,3	0	0,4	0,1	14,6	0,2	16,9	4	2,2	2,8
10,3	0,8	0,7	0	1,2	1,9	26,8	0,5	29,4	10,5	4,9	3,2
5,8	0,8	0,7	0	1,2	0,3	24,8	2,4	30,6	6,3	7	5,9
8,1	0,7	0,6	0	0,6	1,5	22,5	0,4	25	8,6	3,8	3,6
9,3	1,1	1	0	1,1	0,5	26,2	1,6	31,3	9,3	11	1,9

## PORCENTAGENS DO NÚMERO DE LINFÓCITOS NA ES

Paciente	nº leucócitos	%linfócitos	nº linfócitos	CD3+	CD3+ CD4+	CD3+CD8+	CD3+CD4+ CD8+	CD3+CD4- CD8-	CD45RA+	CD4+ CD45RA+
1	7900	15,8	1248	74,7	43,0	27,8	0,1	3,2	94,9	43,0
2	7000	16,7	1169	67,1	26,9	31,1	0,06	2,4	94,6	26,9
3	8300	42,5	3528	55,1	34,6	19,8	0,07	1,6	93,4	34,6
4	12200	19,6	2391	73,0	46,9	15,3	0,2	8,7	89,8	46,9
5	5100	28,1	1433	72,2	49,1	18,5	0,04	2,8	96,4	49,1
6	12000	20,3	2436	72,9	45,8	13,8	0,1	9,4	91,1	45,8
7	5300	30,3	1590	73,0	47,7	20,0	0,03	4,0	96,7	47,7
8	6000	28,4	1704	53,5	32,7	14,8	0,07	3,5	95,1	32,7
9	4100	25,4	1041	87,4	38,6	44,1	0,1	1,6	96,9	38,6
10	8500	24,0	2040	65,8	45,4	17,5	0,08	1,7	96,7	45,4
11	4100	23,1	947	85,7	38,1	45,5	0,2	1,3	97,0	38,1
12	7900	24,1	1904	64,3	44,0	17,4	0,2	1,2	95,9	44,0
13	8100	19,5	1580	73,8	46,7	23,6	0,05	1,0	96,9	46,7
14	8600	17,3	1488	71,1	60,1	7,5	0,06	1,2	97,1	60,1
15	8600	17,6	1514	73,3	61,4	7,4	0,06	1,1	96,0	61,4
16	8400	20,0	1680	76,5	48,5	23,0	0,3	1,0	91,0	48,5
17	8300	18,6	1644	46,8	26,3	16,1	0,3	2,7	91,4	26,3
18	5200	33,8	1758	75,4	41,1	28,4	0,3	1,5	94,1	41,1
19	6800	30,8	2094	80,5	52,9	25,0	0,1	1,6	93,2	52,9
20	7900	18,6	1469	50,0	26,9	17,7	0,2	3,2	88,7	26,9
21	5100	34,3	1749	76,1	42,0	29,7	0,2	0,9	95,9	26,9
22	6700	31,7	2124	80,4	52,4	26,5	0,2	1,6	96,8	42,0
23	4100	34,9	1431	72,5	45,0	20,9	0,2	4,0	96,6	52,4
24	4700	41,7	1960	76,3	52,8	20,9	0,1	1,7	94,5	45,0
25	10700	26,6	2846	65,4	39,5	20,7	0,04	2,6	94,7	52,8
26	4100	36,0	1476	72,5	44,4	21,1	0,06	3,9	94,2	39,5
27	4500	43,3	1949	76,0	52,7	19,6	0,05	1,8	95,2	44,4
28	5000	28,8	1440	63,9	38,2	19,4	0,03	3,1	92,7	52,7
29	7400	29,6	2190	69,3	37,8	28,7	0,34	0,7	95,3	38,2
30	5900	31,5	1859	31,5	45,7	17,8	0,2	1,3	95,2	45,7
31	7500	29,4	22,5	76,9	40,5	34,7	0,2	0,7	94,6	40,5
32	5900	31,2	1841	69,2	46,5	19,9	0,2	2,2	93,3	46,5
33	14400	20,3	2923	59,1	41,9	16,3	0,05	0,2	97,0	41,9
34	13200	18,9	2495	60,8	42,3	17,5	0,2	0,5	89,4	42,3
35	12600	18,0	2268	68,3	53,3	13,3	0,2	0,6	96,1	53,3
36	4600	35,0	1610	68,9	54,6	11,1	0,1	1,7	97,1	54,6
37	8600	19,6	1686	62,8	40,3	18,4	0,5	1,0	96,4	40,3
38	11700	38,0	4446	78,7	45,5	31,1	0,2	1,6	97,6	45,5
39	11100	38,5	4274	75,3	42,3	30,6	0,03	1,6	97,1	42,3
40	6600	28,4	1874	74,6	50,7	19,0	1,4	1,8	92,6	50,7
41	6700	28,4	1903	75,0	50,7	19,0	0,7	1,8	92,3	50,7
42	6900	27,6	1904	74,6	52,5	18,1	0,04	2,9	94,2	52,5



### PORCENTAGENS DO NÚMERO DE LINFÓCITOS NA ES - CONTINUAÇÃO

CD8+ CD45RA+	CD25+	CD4+ CD25+	CD8+ CD25+	CD4+HLA- DR+	CD8+HLA- DR+	CD3+TCR Alfa/Beta	CD3+TCR Gama/Delta	CD2+	CD71+	CD19+	CD56+
27,8	1,9	1,9	0	1,3	9,5	72,2	2,5	82,3	29,1	6,3	5,1
31,1	2,4	2,4	0	1,2	7,2	58,1	9,0	71,3	35,3	7,8	13,2
19,8	1,4	1,4	0	0,7	2,4	53,9	1,2	88,2	20,7	7,8	24,7
15,3	1,0	1,0	0	2,6	2,0	68,9	9,2	83,2	18,4	3,6	8,2
18,5	1,4	1,4	0	2,8	2,5	68,7	3,6	77,9	20,3	7,1	8,2
13,8	1,5	1,5	0	1,5	1,0	62,6	10,3	78,8	14,3	3,9	7,4
20,0	1,3	1,0	0	2,7	2,7	69,7	3,3	79,3	21,3	8,7	7,3
14,8	2,1	2,1	0	1,1	0,2	50,7	2,8	66,5	16,5	0,2	15,1
44,1	1,6	1,6	0	9,4	9,1	85,4	2,0	89,8	45,7	2,4	5,1
17,5	2,1	2,1	0	3,8	2,1	65,0	0,8	72,9	19,1	13,8	9,2
45,5	0,9	0,9	0	10,8	10,8	84,8	0,9	92,2	46,8	2,6	3,9
17,4	1,2	1,2	0	4,1	3,7	63,1	1,2	72,6	20,3	13,7	5,4
23,6	3,1	2,6	0	2,6	2,1	71,8	2,1	77,9	25,1	8,2	0,1
7,5	1,7	1,7	0	2,3	0,6	69,4	1,7	78,0	8,7	6,4	9,2
7,4	1,7	1,7	0	2,8	1,1	70,5	2,8	83,0	8,5	6,8	9,1
23,0	1,5	1,0	0	3,0	3,0	74,0	2,5	81,5	25,5	8,0	2,0
16,1	1,1	1,1	0	2,7	1,6	42,5	4,3	75,3	21,5	3,8	8,6
28,4	1,5	1,5	0	2,4	3,8	74,6	0,9	80,5	30,5	3,0	7,4
25,0	1,3	1,3	0	2,3	6,5	79,2	1,3	85,4	26,0	7,8	1,6
17,7	1,6	1,6	0	3,8	2,7	46,2	3,8	73,1	24,2	4,8	8,6
29,4	1,2	1,2	0	2,0	5,0	75,5	0,6	86,0	30,6	3,8	6,1
26,5	1,3	0,9	0	2,2	8,5	79,2	1,3	85,2	29,7	7,9	1,9
20,9	1,1	1,1	0	2,9	4,0	68,2	4,3	79,4	21,5	6,9	2,0
20,9	1,4	1,4	0	4,8	1,4	74,3	1,9	86,6	20,9	4,6	2,9
20,7	3,0	2,6	0	3,8	1,9	62,0	3,4	73,3	22,6	12,4	0,4
21,1	2,2	1,9	0	3,1	4,2	68,6	3,9	77,5	21,9	8,3	1,4
19,6	0,9	0,9	0	4,8	1,6	74,1	1,8	86,1	19,6	5,1	0,9
19,4	1,7	1,0	0	2,8	2,1	60,1	3,8	68,8	20,8	12,8	0,3
28,7	1,7	1,4	0	3,7	9,8	60,2	1,0	77,4	29,4	5,7	0,07
17,8	2,9	2,9	0	1,6	0,6	63,8	1,6	71,1	19,0	9,5	2,2
35,4	1,4	1,0	0	3,7	11,2	76,2	0,7	79,9	36,7	6,1	0,3
19,9	2,6	1,9	0	1,6	1,0	67,6	1,6	72,1	20,8	10,3	2,6
16,3	4,9	4,4	0	4,4	4,4	59,1	0,1	68,5	18,2	15,8	1,0
17,5	3,2	3,2	0	4,2	5,3	60,3	0,4	71,4	18,5	20,1	1,6
13,3	1,7	1,7	0	3,3	1,7	67,8	0,6	74,4	13,9	20,0	4,4
11,1	2,6	2,3	0	3,4	2,0	67,7	1,1	76,9	11,7	12,9	3,7
18,4	3,6	3,6	0	8,2	6,6	61,2	1,5	65,8	19,4	29,6	0
31,1	1,0	1,0	0	2,1	6,1	76,8	1,8	88,2	31,3	7,4	8,4
30,6	1,6	1,3	0	2,9	9,1	53,5	1,8	88,1	31,9	8,1	9,6
19,0	1,8	1,8	0	3,9	1,8	72,5	2,1	75,7	19,4	12,3	3,9
19,0	1,8	1,8	0	3,5	2,8	73,2	1,8	73,6	19,8	11,3	3,9
18,1	1,1	0,7	0	2,5	2,9	72,1	2,5	79,0	18,5	9,1	5,4

## PORCENTAGENS DO NÚMERO DE LINFÓCITOS NO GRUPO CONTROLE-NORMAL

Paciente	nº leucócitos	% linfócitos	nºlinfócitos	CD3+	CD3+ CD4+	CD3+ CD8+	CD3+CD4+ CD8+	CD3+CD4- CD8-	CD45RA+	CD4+ CD45RA+
50	5100	36,0	1836	74,4	46,9	21,9	0,3	4,2	92,2	46,9
51	5200	35,0	1820	79,7	50	22,9	0,1	4,6	91,1	50
52	6500	27,4	1781	64,2	42,3	16,8	0,1	3,3	93,1	42,3
53	3900	26,6	1037	76,3	39,2	40,6	0,2	0,8	94,7	34,2
54	5400	29,0	1566	78,3	37,9	32,8	0,1	1,7	93,8	37,9
55	7300	26,0	1898	70,4	45,4	17,7	0,1	1,5	93,1	45,4
56	9300	18,1	1683	61,9	35,9	25,4	0,3	1,1	90,6	35,9
57	4500	32,0	1440	78,1	32,8	43,8	0,3	0,3	97,5	32,8
58	4000	41,2	1648	73,8	46,6	21,4	0,1	2,9	97,1	46,6
59	3800	29,8	1132	63,8	43	16,8	0,2	2	91,9	43
60	6100	27,5	1678	59,6	32,7	18,2	0,1	5,5	93,1	32,7
61	8200	30,0	2460	70	50	20	0,1	3,3	95,7	50
62	5400	44,6	2408	67,3	45,5	18,6	0,4	2	96,2	45,5
63	7000	25,0	1750	70,8	32	32,4	0	4	94,8	32
64	6000	27,7	1662	72,2	44	26	0,04	1,4	95,7	44
65	5000	41,5	2075	48,7	36,9	8,9	0,05	1,4	93,7	36,9
66	4600	32,6	1500	60,9	38,7	27,9	0,2	1,2	96,6	38,7
67	8200	28,4	2329	62,3	40,1	14,4	0,2	4,9	89,1	40,1
68	5900	17,9	1056	67	46,9	16,8	0,2	1,7	94,4	46,9
69	11000	24,3	2673	67,9	39,1	24,3	0,4	2,1	89,8	39,1
70	6000	29,1	1746	73,5	41,2	23,4	0,03	5,8	94,2	41,2
71	4200	49,2	2066	68,3	41,9	21,1	0,04	3,5	96,7	41,9
72	6200	26,6	1649	74,8	56,4	14,7	0,08	2,6	96,6	56,4
73	9200	23,7	2180	62,4	44,7	15,6	0,04	0,8	90,3	44,7
74	5900	39,0	2301	70	37,2	26,4	0,3	1,8	100	37,2
75	4200	42,0	1764	64,8	42,4	13,8	0,02	5,5	94,3	42,4
76	5000	33,1	1655	69,2	41,4	24,5	0,2	2,7	94,9	41,4
77	7400	45,4	3360	61,2	37,4	20,5	0,04	1,5	96,9	37,4

**PORCENTAGENS DO NÚMERO DE LINFÓCITOS NO GRUPO CONTROLE-  
NORMAL - CONTINUAÇÃO**

<i>CD8+ CD45RA+</i>	<i>CD25+</i>	<i>CD4+ CD25+</i>	<i>CD8+ CD25+</i>	<i>CD4+ HLA-DR+</i>	<i>CD8+ HLA-DR+</i>	<i>CD3+TCR Alfa/Beta</i>	<i>CD3+TCR Gama/Delta</i>	<i>CD2+</i>	<i>CD71+</i>	<i>CD19+</i>	<i>CD56+</i>
11,1	1,7	0,6	0	1,7	1,1	69,2	5,3	81,4	22,5	8,1	1,4
15,1	1,4	1,1	0	1,4	1,4	74	5,7	83,1	23,4	8,6	1,1
5,8	1,8	1,5	0	1,5	0,7	60,6	3,6	75,2	16,8	10,9	5,8
13,9	1,9	1,9	0	1,9	2,6	75,2	1,1	76,7	40,6	9,8	3,8
7,9	1	1	0	2,4	4,1	72,4	5,9	77,9	32,8	7,9	6,9
12,7	1,5	1,5	0	1,5	1,9	65,4	5	74,2	19,2	12,7	6,9
19,9	3,3	2,8	0	3,9	2,8	58,6	2,8	71,3	27,6	11	10,5
19,0	1,3	0,6	0	2,8	3,4	76,9	1,3	80	43,8	10,3	9,1
10,2	1,5	1,2	0	3,2	1,2	68	5,8	80,3	21,4	7,3	9,7
9,1	2,3	2	0	2	1,7	62,1	1,7	71,8	16,8	6,7	5,4
5,8	1,8	1,5	0	1,1	1,1	52,4	7,3	76,4	18,2	8,4	12,7
11,0	1,7	1,7	0	1,3	1,3	71,7	3,3	80	20	10,3	7,3
9,2	0,9	0,7	0	1,6	1,3	65,2	2	79,4	18,6	9,2	12,1
15,6	1,2	1,2	0	1,6	2	65,6	5,2	84,8	32,4	5,4	8,8
15,9	1,4	1,1	0	4	4	70,4	1,8	78	26	7,2	10,1
2,7	1,2	0,5	0	3,1	0,5	47,2	1,4	66,7	8,9	24,6	9,9
14,1	2,5	1,8	0	4,9	4,6	66,6	2,5	76,7	27,9	15,6	5,2
9,5	1,8	1,4	0	1,4	0,7	57	5,3	76,1	14,4	9,9	7
6,1	1,7	1,7	0	5,6	1,1	65,4	1,7	78,2	16,8	5,6	9,5
15,6	2,1	1,6	0	3,3	3,7	65,8	2,1	78,6	24,3	10,3	12,8
7,2	2,1	1,7	0	2,1	2,1	65,6	7,9	74,6	23,4	9,6	3,8
8,7	1,8	1,4	0	1,2	1,2	64,2	4,1	75,6	21,1	14,4	2,4
5,6	2,3	1,9	0	4,9	0,8	71,4	3,4	83,5	14,7	6,4	7,5
8,4	1,7	1,3	0	1,7	0,4	61,6	0,8	71,3	15,6	9,3	11,8
6,7	2,1	1,8	0	3,1	4,9	68,7	1,3	75,4	26,4	12,6	8,2
5,5	1,9	1,7	0	2,9	0,7	59	5,7	72,9	13,8	16,7	14
10,3	2,1	1,8	0	1,8	4,5	68	1,2	75,5	24,5	11,5	10,9
7,5	2,4	2,2	0	2,4	1,1	57	3,5	68,9	20,5	24,2	4,2

## NÚMERO ABSOLUTO DE LINFÓCITOS NA ES

Paciente	nº leucócitos	% linfócitos	nº linfócitos	CD3+	CD3+CD4+	CD3+CD8+	CD3+CD4+CD8+	CD3+CD4-CD8-	CD45RA+	CD4+CD45RA+	CD8+CD45RA+	CD25+	CD4+CD25+
1	7900	15,8	1248	932	537	347	1	40	1184	537	347	24	24
2	7000	16,7	1169	784	314	364	1	28	1106	314	364	28	28
3	8300	42,5	3528	1944	1221	699	2	56	3295	1221	699	49	49
4	12200	19,6	2391	1745	1121	366	5	208	2147	1121	366	24	24
5	5100	28,1	1433	1035	704	265	0,6	40	1381	704	265	20	20
6	12000	20,3	2436	1776	1116	336	2	229	2219	1116	336	37	37
7	5300	30,3	1590	1161	758	318	0,5	64	1538	758	318	21	16
8	6000	28,4	1704	912	557	252	1	60	1621	557	252	36	36
9	4100	25,4	1041	910	402	459	1	17	1009	402	459	17	17
10	8500	24,0	2040	1342	926	357	2	35	1973	926	357	43	43
11	4100	23,1	947	812	361	431	2	12	919	361	431	9	9
12	7900	24,1	1904	1224	838	331	4	23	1826	838	331	23	23
13	8100	19,5	1580	1166	738	373	0,8	16	1531	738	373	49	41
14	8600	17,3	1488	1058	1075	112	0,9	18	1445	1075	112	25	25
15	8600	17,6	1514	1110	930	112	1	17	1453	930	112	26	26
16	8400	20,0	1680	1285	815	386	5	17	1529	815	386	25	17
17	8300	18,6	1644	769	432	265	5	44	1503	432	265	18	18
18	5200	33,8	1758	1326	723	499	5	26	1654	723	499	26	26
19	6800	30,8	2094	1686	1108	524	2	34	1952	1108	524	27	27
20	7900	18,6	1469	735	395	260	3	47	1303	395	260	24	24
21	5100	34,3	1749	1331	735	519	3	16	1677	735	519	21	21
22	6700	31,7	2124	1708	1113	563	4	34	2056	1113	563	28	19
23	4100	34,9	1431	1037	644	299	3	57	1382	644	299	16	16
24	4700	41,7	1960	1495	1035	410	2	33	1852	1035	410	27	27
25	10700	26,6	2846	1861	1124	589	1	74	2695	1124	589	85	74
26	4100	36,0	1476	1070	655	311	1	58	1390	655	311	32	28
27	4500	43,3	1949	1481	1027	382	1	35	1855	1027	382	18	18
28	5000	28,8	1440	920	550	550	0,4	45	1335	550	279	24	14
29	7400	29,6	2190	1518	828	629	7	15	2087	828	629	37	31
30	5900	31,5	1859	586	850	331	4	24	1770	850	331	54	54
21	7500	29,4	22,5	1696	893	765	4	15	2086	893	781	31	22
23	5900	31,2	1841	1274	856	366	4	41	1718	856	366	48	35
33	14400	20,3	2923	1727	1225	476	1	6	2835	1225	476	143	129
34	13200	18,9	2495	1517	1055	437	5	12	2231	1055	437	80	80
35	12600	18,0	2268	1549	1209	302	5	14	2180	1209	302	39	39
36	4600	35,0	1610	1109	879	179	2	27	1563	879	179	42	37
37	8600	19,6	1686	1059	679	310	8	17	1625	679	310	61	61
38	11700	38,0	4446	3899	202	1383	9	71	4339	202	1383	44	44
39	11100	38,5	4274	3218	1808	1308	1	68	4150	1808	1308	68	56
40	6600	28,4	1874	1395	950	356	26	34	1735	950	356	34	34
41	6700	28,4	1903	1427	965	362	13	34	1756	965	362	34	34
42	6900	27,6	1904	1420	1000	345	1	55	1794	1000	345	21	13

### NÚMERO ABSOLUTO DE LINFÓCITOS NA ES - CONTINUAÇÃO

CD8+ CD25+	CD4+ HLA-DR+	CD8+ HLA-DR+	CD3+TCR Alfa/ Beta	CD3+TCR Gama/ Delta	CD2+	CD71+	CD19+	CD56+
0	16	119	901	31	1027	363	79	64
0	14	84	679	105	833	413	91	154
0	25	85	1902	32	3112	730	275	871
0	62	48	1647	220	1989	440	86	196
0	40	36	984	52	1116	291	102	118
0	37	24	1525	251	1920	348	95	180
0	43	43	1108	52	1261	339	138	116
0	19	3	864	48	1133	281	3	257
0	98	95	889	21	935	476	250	53
0	78	43	1326	16	1487	390	282	188
0	102	102	803	9	873	443	25	37
0	78	70	1201	23	1382	387	261	103
0	41	33	1134	33	1231	397	130	2
0	34	9	1033	25	1161	1295	95	137
0	42	17	1067	42	1257	129	103	138
0	50	50	1243	42	1369	428	134	34
0	44	26	699	71	1238	353	62	141
0	42	67	1311	16	1415	536	53	130
0	48	136	1658	27	1788	544	163	34
0	56	40	679	56	1074	355	71	126
0	35	87	1320	10	1504	535	66	107
0	47	181	1682	28	1810	631	168	40
0	41	57	976	62	1556	308	99	29
0	94	27	1456	37	1697	410	90	57
0	108	54	1765	97	2086	643	353	11
0	46	62	1013	58	1144	323	123	21
0	94	31	1444	35	1678	382	99	18
0	40	30	865	55	991	300	184	4
0	81	215	1494	22	1695	644	125	2
0	30	11	1186	30	1322	353	177	41
0	82	247	1680	15	1762	809	135	7
0	29	18	1245	29	1327	383	190	48
0	129	129	1723	3	2002	532	462	29
0	105	132	1504	10	1781	462	501	40
0	75	39	1538	14	1687	315	454	100
0	55	32	1090	18	1238	188	208	60
0	138	111	1032	25	1109	327	499	0
0	93	271	3415	80	3921	1383	329	373
0	124	389	2287	77	3765	1363	346	410
0	73	34	1359	39	1419	364	231	73
0	67	53	1393	34	1401	377	215	74
0	48	55	1372	48	1504	352	173	103

## NÚMERO ABSOLUTO DE LINFÓCITOS NO GRUPO CONTROLE

Paciente	nºleucócitos	% linfócitos	nºlinfócitos	CD3+	CD3+ CD4+	CD3+ CD8+	CD3+CD4+ CD8+	CD3+CD4- CD8-	CD45RA+	CD4+ CD45RA+
50	5100	36,0	1836	1366	861	402	6	77	1693	861
51	5200	35,0	1820	1451	910	417	2	84	1658	910
52	6500	27,4	1781	1143	753	299	2	59	1658	753
53	3900	26,6	1037	791	355	421	2	8	982	355
54	5400	29,0	1566	1226	594	514	2	27	1469	594
55	7300	26,0	1898	1336	862	336	2	28	1767	862
56	9300	18,1	1683	1042	604	427	5	19	1525	604
57	4500	32,0	1440	1125	472	631	4	4	1404	472
58	4000	41,2	1648	1216	768	353	2	48	1600	768
59	3800	29,8	1132	722	487	190	2	23	1040	487
60	6100	27,5	1678	1000	549	305	2	92	1562	549
61	8200	30,0	2460	1845	1230	482	2	81	2354	1230
62	5400	44,6	2408	1621	1096	448	4	48	2316	1096
63	7000	25,0	1750	1239	560	567	0	70	1659	560
64	6000	27,7	1662	1200	731	432	1	23	1591	731
65	5000	41,5	2075	1011	766	185	1	29	1944	766
66	4600	32,6	1500	1035	581	419	3	18	1449	581
67	8200	28,4	2329	1451	934	335	5	114	2075	934
68	5900	17,9	1056	708	495	177	2	18	997	495
69	11000	24,3	2673	1815	1045	650	11	56	2400	1045
70	6000	29,1	1746	1283	719	409	1	101	1645	719
71	4200	49,2	2066	1411	866	436	1	72	1998	866
72	6200	26,6	1649	1233	930	242	1	43	1593	930
73	9200	23,7	2180	1360	974	340	1	17	1969	974
74	5900	39,0	2301	1611	856	607	7	41	2301	856
75	4200	42,0	1764	1143	748	243	0,4	97	1663	748
75	5000	33,1	1655	1145	685	405	3	45	1571	685
77	7400	45,4	3360	2056	1257	689	1	50	3256	1257

**NÚMERO ABSOLUTO DE LINFÓCITOS NO GRUPO CONTROLE –  
CONTINUAÇÃO**

<i>CD8+ CD45RA+</i>	<i>CD25+</i>	<i>CD4+ CD25+</i>	<i>CD8+ CD25+</i>	<i>CD4+ HLA-DR+</i>	<i>CD8+ HLA-DR+</i>	<i>CD3+TCR Alfa/ Beta</i>	<i>CD3+TCR Gama/Delta</i>	<i>CD2+</i>	<i>CD71+</i>	<i>CD19+</i>	<i>CD56+</i>
402	31	11	0	31	20	1271	97	1495	413	149	26
417	25	20	0	25	25	1347	104	1512	426	157	20
299	32	27	0	27	12	1079	64	1339	299	194	103
421	20	20	0	20	27	780	11	795	421	102	39
514	16	16	0	38	64	1134	92	1220	514	124	108
336	28	28	0	28	36	1241	95	1408	364	241	131
427	56	47	0	66	47	986	47	1200	465	185	177
631	15	9	0	40	49	1107	19	1152	631	148	131
353	25	20	0	53	20	1121	96	1323	359	120	160
190	26	23	0	23	19	703	19	813	201	76	61
305	30	25	0	18	18	879	122	1282	342	141	213
482	42	42	0	32	32	1764	81	1968	492	253	180
448	22	17	0	39	31	1570	48	1912	448	222	291
567	21	21	0	28	35	1148	91	1484	567	95	154
432	23	18	0	66	66	1170	30	1296	432	120	168
185	25	10	0	64	10	979	29	1384	191	510	205
419	38	27	0	74	69	999	38	1151	419	234	78
335	42	33	0	33	16	1328	123	1772	345	231	163
177	18	18	0	59	12	691	18	826	189	59	100
650	56	43	0	88	99	1759	56	2101	660	275	342
409	37	30	0	37	37	1145	138	1303	414	168	66
436	37	29	0	25	25	1326	85	1562	459	298	50
242	38	31	0	81	13	1177	56	1377	254	106	124
340	37	28	0	37	9	1343	17	1554	368	203	257
607	48	41	0	71	113	1581	30	1735	619	290	189
243	34	30	0	51	12	1041	101	1286	265	295	247
405	35	30	0	30	74	1125	20	1250	430	190	180
689	81	74	0	81	37	1939	118	2315	689	813	141

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Células e tecidos do sistema imune. In: \_\_\_\_\_. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Revinter, 1995, p. 13-33.
- ALARCÓN-SEGOVIA, D.; PALACIOS, R.; KASEP, G.I. Human post-thymic precursor cells in health and disease. Immunoregulatory circuits of the peripheral blood mononuclear cells from patients with progressive systemic sclerosis. **J. Clin. Lab. Immunol.**, v. 5, p. 143-148, 1981.
- ALPERT, S. D.; KOIDE, J.; TAKADA, S.; ENGLEMAN, E. G. T cell regulatory disturbances in the rheumatic diseases. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 13, p. 431-445, 1987.
- ALTMAN, R. D.; MEDSGER Jr., T. A.; BLOCH, D. A.; MICHEL, B. A. Predictors of survival in systemic sclerosis (scleroderma). **Arthritis Rheum.**, v. 34, p. 403-413, 1991.
- ANDRADE, L. E. C. **Capilaroscopia periungueal. Estudo da metodologia e tentativa de padronização da normalidade para a população brasileira**. São Paulo, 1987. Tese (Doutorado) – Escola Paulista de Medicina.
- BARCLAY, A. N.; BIRKELAND, M. L.; BROWN, M. H.; BEYERS, A. D.; DAVIS, S. J.; SOMOZA, C.; WILLIAMS, A. F. Leucocyte antigen. In: \_\_\_\_\_. **The Leucocyte Antigen Facts Book**. London: Academic Press, 1993.
- BARNETT, A. J.; MILLER, M. H.; LITTLEJOHN, G. O. A survival study of patients with scleroderma diagnosed over 30 years (1953-1983): the value of a simple cutaneous classification in the early stages of the disease. **J. Rheumatol.**, v. 15, p. 276-283, 1988.

- BARNETT, A. J.; McNEILAGE, L. J. Antinuclear antibodies in patients with scleroderma (systemic sclerosis) and in their blood relatives and spouses. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 52, p. 365-368, 1993.
- BEACOCK-SHARP, H.; YOUNG, J. L.; GASTON, J. S. H. Analysis of T cell subsets present in the peripheral blood and synovial fluid of reactive arthritis patients. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 57, p. 100-106, 1998.
- BEHM, F. G. Malignancies of the bone marrow. In: PARHAM, D. M. **Pediatric neoplastic: morphology and biology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996, p. 449-504.
- BELCH, J. J. F. Raynaud's phenomenon: its relevance to scleroderma. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 50, p. 839-845, 1991.
- BENNETT, R. M. Scleroderma overlays syndromes. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 16, p. 185-198, 1990.
- BLACK, C. M. Systemic sclerosis "state of the art" 1995. **Scand. J. Rheumatol.**, v. 24, p. 194-196, 1995.
- BOARETTI, A. C. **Estudo do polimorfismo genético do fator B do sistema complemento em Esclerose Sistêmica**. Curitiba, 1998. Tese (Professor Titular) – Universidade Federal do Paraná.
- BOCKENSTEDT, L. K.; GOLDSMITH, M. A.; KORETZKY, G. A.; WEISS, A. The activation of T lymphocytes. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 13, p. 411-429, 1987.
- BOLSTER, M. B.; SILVER, R. M. Assessment and management of scleroderma lung disease. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 11, p. 508-513, 1999.

BORG, E. J.; PIERSMA-WICHES, G.; SMIT, A. J.; KALLENBERG, C. G. M.; WOUDA, A. A. Serial nailfold capillary microscopy in primary Raynaud's phenomenon and scleroderma. **Semin. Arthr. Rheum.**, v. 24, p. 40-47, 1994.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters**. New York: Wiley, 1978.

BREZINSCHKE, R. I.; LIPSKY, P. E.; GALEA, P.; VITA, R.; OPPENHEIMER-MARKS, N. Phenotypic characterization of CD4+ T cells that exhibit a transendothelial migratory capacity. **J. Immunol.**, v. 154, p. 3062-3977, 1995.

BRIGGS, D.; BLACK, C.; WELSH, K. Genetic factors in scleroderma. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 16, p. 31-51, 1990.

BRIGGS, D.; WELSH, K. I. Major histocompatibility complex class II genes and systemic sclerosis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 50, p. 862-865, 1991.

BRUNS, M.; HERRMANN, K.; HAUSTEIN, U. F. Immunologic parameters in systemic sclerosis. **Int. J. Dermatol.**, v. 33, p. 25-32, 1994.

BYERS, R. J.; MARSHALL, D. A. S.; FREEMONT, A. J. Pericardial involvement in systemic sclerosis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 56, p. 393-394, 1997.

CARPENTIER, P. H.; MARICQ, H. R. Microvasculature in systemic sclerosis. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 16, p. 75-91, 1990.

CASSIDY, J. T.; PETTY, R. E. The sclerodermas and related disorders. In: \_\_\_\_\_. **Textbook of Pediatric Rheumatology**. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 1995, p. 423-465.

- CATOGGIO, L. J.; BERNSTEIN, R. M.; BLACK, C. M.; HUGHES, G. R. V.; MADDISON, P. J. Serological markers in progressive systemic sclerosis: clinical correlations. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 42, p. 23-27, 1983.
- CERINIC, M. M.; GENERINI, S.; PIGNONE, A.; CASALE, R. The nervous system in systemic sclerosis (scleroderma). Clinical features and pathogenetic mechanisms. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 22, p. 879-892, 1996.
- CERINIC, M. M.; GENERINI, S.; PIGNONE, A. New approaches to the treatment of Raynaud's phenomenon. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 9, p. 544-556, 1997.
- CIVITA, L.; ROSSI, M.; VAGHEGGINI, G.; STORINO, F. A. A.; CREDIDIO, L.; PASERO, G.; GIUSTI, C.; FERRI, C. Microvascular involvement in systemic sclerosis: laser doppler evaluation of reactivity to acetylcholine and sodium nitroprusside by iontophoresis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 57, p. 52-55, 1998.
- CLEMENTS, P. J. Measuring disease activity and severity in scleroderma. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 7, p. 517-521, 1995.
- CROMBRUGGHE, B.; VUORIO, T.; KARSENTY, G. Control of type I collagen genes in scleroderma and normal fibroblasts. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 16, p. 109-123, 1990.
- CROMBRUGGHE, B.; VUORIO, T.; KARSENTY, G.; MAITY, S.; RUTHESHOUSER, E. C.; GOLDBERG, M. Transcriptional control mechanisms for the expression of type I collagen genes. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 50, p. 872-876, 1991.
- DAU, P. C.; CALLAHAN, J. P. Immune modulation during treatment of systemic sclerosis with plasmapheresis and immunosuppressive drugs. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 70, p. 159-165, 1994.

DESWAL, A.; FOLLANSBEE, W. P. Cardiac involvement in scleroderma. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 22, p. 841-860, 1996.

De JESUS, D. G.; CLANCY, R. L. Circulating T and B lymphocytes in progressive systemic sclerosis. **J. Rheumatol.**, v. 2, p. 336-347, 1975.

DOMAGALA-KULAWIK, J.; HOSER, G.; KAWALEC, M.; DOBOSZYNSKA, A.; KAWIAK, J.; DROSZCZ, W. Lymphocyte phenotyping in systemic sclerosis: a flow cytometry analysis of lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v. 19, p. 264-270, 1997.

ERCOLE, L. P. **Capilaroscopia periungueal. Valor prático no diagnóstico das doenças do tecido conjuntivo: Artrite Reumatóide, Lupus Eritematoso Sistêmico, Esclerodermia e Dermatomiosite.** Curitiba, 1993. Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.

ERCOLE, L. P. Capilaroscopia periungueal. Valor prático no diagnóstico das doenças do tecido conjuntivo: artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico, esclerodermia e dermatomiosite. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 34, p. 289-297, 1994.

ERCOLE, L. P.; RACHID, A. Capilaroscopia periungueal: análise de 105 pacientes com doenças do tecido conjuntivo. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 36, p. 259, 1996.

FAMULANO, G.; QUINTIERI, F.; D'AMBROSIO, A.; PIZZUTO, F.; GIACOMELLI, R.; PUGLIESE, O.; TONIETTI, G. Espansione delle cellule NK CD56+ con ridotta citotossicità in una paziente affetta da sclerosi sistemica. **Recenti Progr. Med.**, v. 83, p. 18-20, 1992.

FERNANDES, S. R.M.; MARQUES NETO, J. F.; FIWETTI, R. M. I.; SAMARA, A. M. Manifestações osteoarticulares na esclerose sistêmica. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 28, p. 65-69, 1988.

FIOCCO, U.; ROSADA, M.; COZZI, L.; ORTOLANI, C.; De SILVESTRO, G.; RUFFATTI, A.; COZZI, E.; GALLO, C.; TODESCO, S. Early phenotypic activation of circulating helper memory T cells in scleroderma: correlation with disease activity. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 52, p. 272-277, 1993.

FLEISHMAJER, R.; PERLISH, J. S.; REEVES, J. R. T. Cellular infiltrates in scleroderma skin. **Arthritis Rheum.**, v. 20, p. 975-984, 1977.

FRIERI, M.; CHANNABASAPPA, A.; PAOLANO, A.; OSTER, N.; BLAU, S.P.; YANG, S.; MELE, C.; HAWRYLKO, E. Altered T cell subpopulations and lymphocytes expressing natural killer cell phenotypes in patients with progressive systemic sclerosis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 87, p. 773-779, 1991.

FROES, L. D.; PICARELLI, M. M.; ASTIGARAGA, C. C.; STAUB, H. L.; KEISERMAN, M. W. Esclerose sistêmica e púrpura trombocitopênica. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 33, p. 204-206, 1993.

FURST, D. E.; CLEMENTS, P. J. Hypothesis for the pathogenesis of systemic sclerosis. **J. Rheumatol.**, v. 24, s. 48, p. 53-57, 1997.

GALÉA, P.; BREZINSCHKE, R. I.; LIPSKY, P. E.; OPPENHEIMER-MARKS, N. Phenotypic characterization of CD4-/αβ TCR+ and γδ TCR+ T cells with a transendothelial migratory capacity. **J. Immunol.**, v. 153, p. 529-542, 1994.

GERBRACHT, D. D.; STEEN, V. D.; ZIEGLER, G. L.; MEDSGER Jr., T. A.; RODNAN, G. P. Evolution of primary Raynaud's phenomenon (Raynaud's disease) to connective tissue disease. **Arthritis Rheum.**, v. 28, p. 87-92, 1985.

GERLI, R.; AGEA, E.; BERTOTTO, A. Analysis of T cells bearing different isotypic forms of the γδ T cell receptor in patients with systemic autoimmune diseases. **J. Rheumatol.**, v. 18, p. 1504-1510, 1991.

- GIACOMELLI, R.; MATUCCI-CERINIC, M.; CIPRIANI, P.; GHERSETICH, I.; LATTANZIO, R.; PAVAN, A.; PIGNONE, A.; CAGNONI, M. L.; LOTTI, T.; TONIETTI, G. Circulating V $\delta$ 1+ T cells are activated and accumulate in the skin of systemic sclerosis patients. **Arthritis Rheum.**, v. 41, p. 327-334, 1998.
- GIORDANO, M.; VALENTINI, G.; MIGLIARESI, S.; PICCILLO, N.; VATTI, M. Different antibody patterns and different prognosis in patients with scleroderma with various extent of skin sclerosis. **J. Rheumatol.**, v. 13, p. 911-916, 1986.
- GRANIER, F.; VAYSSAIRAT, M.; PRIOLLET, P.; HOUSSET, E. Nailfold capillary microscopy in mixed connective tissue disease. **Arthritis Rheum.**, v. 29, p. 189-195, 1986.
- GUDBJÖRNSSON, B.; HÄLLGREN, R.; NETTELBLADT, A.; GUSTAFSSON, R.; MATTSSON, A.; GEIJERSTAM, E.; TÖTTERMAN, T. H. Phenotypic and functional activation of alveolar macrophages, T lymphocytes and NK cells in patients with systemic sclerosis and primary Sjögren's syndrome. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 53, p. 574-579, 1994.
- GURUBHAGAVATULA, I.; PALEVSKY, H. I. Pulmonary hypertension in systemic autoimmune disease. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 23, p. 365-394, 1997.
- GUPTA, S.; MALAYIVA, A. N.; RAJAGOPOLAN, P. Subpopulations of human T lymphocytes. Imbalance of T cell subpopulations in patients with progressive systemic sclerosis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 38, p. 342-347, 1979.
- GUSTAFSSON, R.; TÖTTERMAN, T. H.; KLARESKOG, L.; HÄLLGREN, R. Increase in activated T cells and reduction in suppressor inducer T cells in systemic sclerosis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 49, p. 40-45, 1990.
- HARVEY, G.R.; McHUGH, N. J. Serologic abnormalities in systemic sclerosis. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 11, p. 495-502, 1999.

- HEBBAR, M.; LASSALLE, P.; DELNESTE, Y.; HATRON, P. Y.; DEVULDER, B.; TONNEL, A. B.; JANIN, A. Assessment of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis and Sjögren's syndrome. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 56, p. 230-234, 1997.
- HERRICK, A. L.; HEANEY, M.; HOLLIS, S.; JAYSON, M. I.V. Anticardiolipin, anticentromere and anti-Scl-70 antibodies in patients with systemic sclerosis and severe digital ischaemia. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 53, p. 540-542, 1994.
- HERRICK, A. L. Advances in palliative care for the patient with scleroderma. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 8, p. 555-560, 1996.
- HERRICK, A. L.; CLARK, S. Quantifying digital vascular disease in patients with primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 57, p. 70-78, 1998.
- HOLCOMBE, R. F.; BAETHGE, B. A.; WOLF, R. E.; BETZING, K. W.; STEWART, R. M. Natural killer cells and  $\gamma\delta$  T cells in scleroderma: relationship to disease duration and anti-Scl-70 antibodies. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 54, p. 69-72, 1995.
- HOUTMAN, P. M.; KALLENBERG, C. G. M.; WOUDA, A. A.; THE, T. H. Decreased nailfold capillary density in Raynaud's phenomenon: a reflection of immunologically mediated local and systemic vascular disease? **Ann. Rheum. Dis.**, v. 44, p. 603-609, 1985.
- HUGHES, P.; HOLT, S.; ROWELL, N. R. Thymus dependent (T) lymphocyte deficiency in progressive systemic sclerosis. **Brith. J. Dermatol.**, v. 95, p. 342-347, 1979.
- INNOCENCIO, R. M.; SAMPAIO-BARROS, P. D.; CAPITANI, E. M.; SOUZA, M. L.; MARQUES NETO, J. F. Esclerose sistêmica associada à silicose pulmonar: relato de caso. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 38, p. 249-252, 1998.



- INOSHITA, T.; WHITESIDE, T. L.; RODNEN, G. P.; TAYLOR, F. H. Abnormalities of T lymphocyte subsets in patients with progressive systemic sclerosis (PSS, scleroderma). **J. Lab. Clin. Med.**, v.97, p. 264-277, 1981.
- INSUA-VILARINO, S.; HERA-MARTINES, M.; VALVERDE, V.R.; PERZ, J. M.; VALDIVIESO, J. L. A.; RUIZ, T. Espectro clinico de pacientes com anticuerpos anticentromero. **Rev. Clin. Esp.**, v. 192, p. 260-264, 1993.
- JACOBSEN, S.; HALBERG, P.; ULLMAN, S. Mortality and causes of death of 344 danish patients with systemic sclerosis (scleroderma). **Brit. J. Rheumatol.**, v. 37, p. 750-755, 1998.
- JIMÉNEZ, S. A. Cellular immune dysfunction and the pathogenesis of scleroderma. **Semin. Arthr. Rheum.**, v. 13, p. 104-113, 1983.
- KAHALEH, M. B.; LeROY, E. C. T cell-dependent mechanisms in scleroderma. **Arthritis Rheum.**, v. 31, p. S21, 1988.
- KAHALEH, M. B.; LeROY, E. C. Interleukin-2 in scleroderma: correlation of serum level with extent of skin involvement and disease duration. **Ann. Int. Med.**, v. 110, p. 446-450, 1989.
- KAHALEH, M. B. Vascular disease in scleroderma. Endothelial T lymphocyte-fibroblast interactions. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 16, p. 53-73, 1990.
- KAHALEH, M. B. Immunologic aspects of scleroderme. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 5, p. 760-765, 1993.
- KAHALEH, M. B. Raynaud's phenomenon and the vascular disease in scleroderma. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 7, p. 529-534, 1995.

KAHAN, A.; GERFAUX, J.; KAHAN, A.; JORET, A. M.; MENKES, C. J.; AMOR, B. Increased proto-oncogene expression in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic sclerosis. **Arthritis Rheum.**, v. 32, p. 430-436, 1989.

KAHAN, A.; KAHAN, A.; PICARD, F.; MENKES, C. J.; AMOR, B. Abnormalities of T lymphocyte subsets in systemic sclerosis demonstrated with anti-CD45RA and anti-CD29 monoclonal antibodies. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 50, p. 354-358, 1991.

KALLENBERG, C. G. M. Early detection of connective tissue disease in patients with Raynaud's phenomenon. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 16, p. 11-30, 1990.

KALLENBERG, C. G. M. Connective tissue disease in patients presenting with Raynaud's phenomenon alone. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 50, p. 666-667, 1991.

KANE, G. C.; VARGA, J.; CONANT, E. F.; SPIRN, P. W.; JIMENES, S.; FISH, J. E. Lung involvement in systemic sclerosis (scleroderma): relation to classification based on extent of skin involvement or autoantibody status. **Respir. Med.**, v. 90, p. 223-230, 1996.

KANTOR, T. V.; WHITESIDE, T. L.; FRIBERG, D.; BUCKINGHAM, R. B.; MEDSGER Jr., T. A. Lymphokine-activated killer cell and natural killer cell activities in patients with systemic sclerosis. **Arthritis Rheum.**, v. 35, p. 694-699, 1992.

KEREN, D. F. History and evolution of surface marker assays. In: KEREN, D. F.; HANSON, C. A.; HURTUBISE, P. E. **Flow Cytometry and Clinical Diagnosis**. Chicago: American Society of Clinical Pathologists. 1994, p. 1-25.

KEYSTONE, E. C.; LAU, C.; GLADMAN, D. D.; WILKINSON, S.; LEE, P.; SHORE, A. Immunoregulatory T cell subpopulations in patients with scleroderma using monoclonal antibodies. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 48, p. 443-488, 1982.

KIENER, H.; GRAMINGER, W. B.; MACHOLD, K.; ARINGER, M. Increased levels of circulating intercellular adhesion molecule-1 in patients with systemic sclerosis. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v. 12, p. 483-487, 1994.

KLEINBAUM, D. G. **Logistic regression: a self-learning text**. New York: Springer-Verlag, 1994.

LALLY, E. V.; JIMENEZ, S. A.; KAPLAN, S. R. Progressive systemic sclerosis: mode of presentation, rapidly progressive disease course and mortality based on na analysis of 91 patients. **Semin. Arthr. Rheum.**, v. 18, p. 1-13, 1988.

LEE, E. B.; ANHALT, G. J.; VOORHEES, J. J.; DIAZ, L. A. Pathogenesis of scleroderma. Current concepts. **Int. J. Dermatol.**, v. 23, p. 85-89, 1984.

LEE, P.; LEUNG, F. Y. K.; ALDERDICE, C.; ARMSTRONG, S. K. Nailfold capillary microscopy in the connective tissue diseases: a semi-quantitative assessment. **J. Rheumatol.**, v. 10, p. 930-938, 1983.

LEE, P. Systemic sclerosis following physical trauma. **J. Rheumatol.**, v. 23, p. 1689-1690, 1996.

LEE, S. L.; TSAY, G. J.; TSAI, R. T. Anticentromere antibodies in subjects with no apparent connective tissue disease. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 52, p. 586-589, 1993.

LEHMAN, T. J. A. Systemic and localized scleroderma in children. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 8, p. 576-579, 1996.

LeROY, E. C.; MARICQ, H. R.; KAHALEK, M. B. Undifferentiated conective tissue syndromes. **Arthritis Rheum.**, v. 23, p. 341-343, 1980.

LeROY, E. C.; BLACK, C.; FLEISCHMAJER, R.; JABLONSKA, S.; KRIEG, T.; MEDSGER Jr., T. A.; ROWELL, N.; WOLLHEIM, F. Scleroderma (systemic

sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. **J. Rheumatol.**, v. 15, p. 202-205, 1988.

LeROY, E. C. Systemic sclerosis. A vascular perspective. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 22, p. 675-694, 1996.

MACEDO, A.; ORFAO, A.; GONZÁLEZ, M.; VIDRIALES, M. B.; LÓPES-BERGER, M. C.; MARTÍNEZ, A.; SAN MIGUEL, J. F. Immunological detection of blast cell subpopulations in acute myeloblastic leukemia at diagnosis: implications for minimal residual disease studies. **Leukemia**, v. 9, p. 993-998, 1995.

MACEY, M. G. Immunophenotypic analysis of lymphocytes and leukaemias. In: \_\_\_\_\_. **Flow Cytometry – Clinical Applications**. Oxford: Beackwell, 1994, p. 67-100.

MANOLIOS, N.; DUNCKLEY, H.; CHIVERS, T.; BROOKS, P.; ENGLERT, H. Immunogenetic analysis of 5 families with multicase occurrence of scleroderma and/or related variants. **J. Rheumatol.**, v. 22, p. 85-92, 1995.

MARICQ, H. R. Widefield capillary microscopy: technique and rating scale for abnormalities seen in scleroderma and related disorders. **Arthritis Rheum.**, v. 24, p. 1159-1165, 1981.

MARICQ, H. R.; MAIZE, J. C. Nailfold capillary abnormalities. **Clin. Rheum. Dis.**, v. 8, p. 455-478, 1982.

MARQUES NETO, J. F.; SAMARA, A. M. Esclerodermia. In: SAMARA, A. M. **Reumatologia**. São Paulo: Sarvier, 1985, p. 258-296.

MARQUES NETO, J. F.; SAMPAIO-BARROS, P. D. Conferência internacional sobre esclerose sistêmica. Termas de Montecatini – março/1998. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 38, p. 264-268, 1998.

- MASI, A. T.; RODNAN, G. P.; MEDSGER Jr, T. A.; ALTMAN, R. D.; D'ANGELO, W. A.; FRIES, J. F.; LeROY, E. C.; KIRSNER, A. B.; MacKENZIE, A. H.; McSHANE, D. J.; MYERS, A. R.; SHARP, G. C. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). **Arthritis Rheum.**, v. 23, p. 581-590, 1980.
- MAUCH, C.; KRIEG, T. Fibroblast-matrix interactions and their role in the pathogenesis of fibrosis. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 16, p. 93-107, 1990.
- MAYES, M. D. Scleroderma epidemiology. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 22, p. 751-764, 1996.
- MAYES, M. D. Epidemiology of systemic sclerosis and related disease. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 9, p. 557-561, 1997.
- McCOY, J. P. Basic principles in clinical flow citometry. In: KEREN, D. F.; HANSON, C. A.; HURTUBISE, P. E. **Flow Citometry and Clinical Diagnosis**. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1994, p. 26-55.
- MEDSGER Jr., T. A. Systemic sclerosis (scleroderma), eosinophilic fasciitis and calcinosis. In: McCARTY, D. J. **Arthritis and Allied Conditions**. 10.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 1118-1165, 1989.
- MEDSGER Jr., T. A. Treatment of systemic sclerosis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 50, p. 877-886, 1991.
- MILLER, E. B.; HISERODT, J. C.; HUNT, L. E.; STEEN, V. D.; MEDSGER Jr., T. A. Reduced natural killer cell activity in patients with systemic sclerosis: correlation with clinical disease type. **Arthritis Rheum.**, v.31, p.1515-1523, 1988.
- MITCHELL, H.; BOLSTER, M. B.; LeROY, E. C. Scleroderma and related conditions. **Med. Clin. North Am.**, v. 22, p. 751-764, 1997.

- MOLDEN, D. P.; NAKAMURA, R. M.; TAN, E. M. Standardization of the immunofluorescence test for autoantibody to nuclear antigens (ANA): use of reference sera of defined antibody specificity. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 82, p. 57-66, 1984.
- MOREL, P. A.; CHENG, H. J.; WILSON, J. W.; CONTE, C.; FALKNER, D.; TWEARDY, D. J.; MEDSGER Jr., T. A. HLA and ethnic associations among systemic sclerosis patients with anticentromere antibodies. **Hum. Immunol.**, v. 42, p. 35-42, 1995.
- MÜHLEN, C. A.; TAN, E. M. Autoantibody specificities in autoimmune rheumatic diseases. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 34, p. 173-194, 1994.
- MÜHLEN, C. A.; TAN, E. M. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. **Semin. Arthr. Rheum.**, v. 24, p. 323-358, 1995.
- NICHOLSON, J. K. A.; McDOUGAL, J.S.; HEARN, T. L.; COLLINS, C. L.; VELLECA, W. M.; JONES, M. K.; GERBER, A. R. (CDC) 1994 Revised guidelines for the performance of CD4+ T-cell determinations in persons with human immunodeficiency virus (HIV) infection. **MMWR**, v. 43, p. 1-21, 1994.
- OHTSUKA, T.; HASEGAWA, A.; NAKANO, A.; YAMAYAGE, A.; YAMAGUCHI, M.; MIYACHI, Y. Nailfold capillary abnormality and pulmonary hypertension in systemic sclerosis. **Int. J. Dermatol.**, v. 36, p. 116-122, 1997.
- OKANO, Y.; STEEN, V. D.; MEDSGER Jr., T. A. Autoantibody reactive with RNA polymerase III in systemic sclerosis. **Ann. Inter. Med.**, v. 119, p. 1005-1013, 1993.
- OKANO, Y. Antinuclear antibody in systemic sclerosis (scleroderma). **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 22, p. 709-735, 1996.
- OLSEN, N. J.; KING Jr., L. E.; PARK, J. H. Muscle abnormalities in scleroderma. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 22, p. 783-796, 1996.

ORFAO, A.; BUITRAGO, J. M. G. Detección y cuantificación de antígenos celulares. In: \_\_\_\_\_. **La citometría de flujo en el laboratorio clínico**. Salamanca: Vigor, 1995, p. 31-51.

OWENS, M. A.; LOKEN, M. R. Components of flow cytometric immunophenotyping. In: \_\_\_\_\_. **Flow cytometry principles for clinical laboratory practice: quality assurance for quantitative immunophenotyping**. New York: Wiley-Liss, 1995, p. 17-44.

PARASKEVAS, F.; FOERSTER, J. The lymphocytes. In: LEE, G. R.; BITHELL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J. W.; LUKENS, J. N. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 9.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p. 354-430.

PARODI, A.; PUIATTI, P.; REBORA, A. Serological profiles as prognostic clues for progressive systemic scleroderma: The Italian experience. **Dermatologica**, v. 183, p. 15-20, 1991.

PIRRUCCELLO, S. J.; JOHNSON, D. R. Reagents for flow cytometry: monoclonal antibodies and hematopoietic cell antigens. In: KEREN, D. F.; HANSON, C. A.; HURTUBISE, P.E. **Flow Cytometry and Clinical Diagnosis**. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1994, p. 56-78.

POPE, J. E.; BELLAMY, N. Outcome measurement in scleroderma clinical trials. **Semin. Arthr. Rheum.**, v. 23, p. 22-33, 1993.

POPE, J. E. Treatment of systemic sclerosis. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 22, p. 893-907, 1996.

POSTLETHWAITE, A. E. Early immune events in scleroderma. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 16, p. 125-139, 1990.

POSTLETHWAITE, A. E. Connective tissue metabolism including cytokines in scleroderma. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 7, p. 535-540, 1995.

REGO, E. M. **Subpopulações linfocitárias na medula óssea normal de crianças e adultos. Significado clínico da heterogeneidade da intensidade de expressão do antígeno CD10 na leucemia linfóide aguda do subtipo comum.** Ribeirão Preto, 1997. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

REIMER, G. Autoantibodies against nuclear, nucleolar and mitochondrial antigens in systemic sclerosis (scleroderma). **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 16, p.169-183, 1990.

RODNAN, G. P.; Di BARTOLOMEO, A.; MEDSGER Jr., T. A. Eosinophilic fasciitis. Report of six cases of a newly recognized scleroderma-like syndrome. [Abstract] **Arthritis Rheum.**, v. 18, p. 525, 1975.

ROSEN, A.; CASCIOLA-ROSEN, L.; WIGLEY, F. Role of metal-catalyzed oxidation reactions in the early pathogenesis of scleroderma. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 9, p. 538-543, 1997.

ROUMM, A. D.; WHITESIDE, T. L.; MEDSGER Jr., T. A.; RODNAN, G. P. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. **Arthritis Rheum.**, v. 27, p. 645-653, 1984.

SAKAMOTO, A.; SUMIDA, T.; MAEDA, T.; ITOH, M.; ASAI, T.; TAKAHASHI, H.; YOSHIDA, S.; KOIKE, T.; TOMIOKA, H.; YOSHIDA, S. T cell receptor V $\beta$  repertoire of double-negative  $\alpha/\beta$  cells in patients with systemic sclerosis. **Arthritis Rheum.**, v. 35, p. 944-948, 1992.

SAMPAIO-BARROS, P. D. **Reavaliação da abordagem clínica e laboratorial da Esclerose Sistêmica: análise prospectiva de 56 pacientes.** Campinas, 1993. Tese (Doutorado) – UNICAMP.



- SAMPAIO-BARROS, P. D.; ZOLLNER, R. L.; OLIVEIRA, R. M.; MARQUES NETO, J. F. Perfil de auto-anticorpos na esclerose sistêmica. **Acta. Reuma. Port.**, v. 75, p. 181-186, 1995.
- SAMPAIO-BARROS, P. D.; AMSTALDEN, E. M. I.; SAMARA, A. M.; MARQUES NETO, J. F. Escore cutâneo total na esclerose sistêmica. **Rev. Bra. Reumatol.**, v. 37, p. 260-266, 1997.
- SANCHEZ-ROMAN, J.; WICHMANN, I.; SALABERRI, J.; VARELA, J. M.; NUNEZ-ROLDAN, A. Multiple clinical and biological autoimmune manifestations in 50 workers after occupational exposure to silica. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 52, p. 534-538, 1993.
- SATO, S. Abnormalities of adhesion molecules and chemokines in scleroderma. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 11, p. 503-507, 1999.
- SEIBOLD, J. R. Systemic sclerosis. Clinical features. In: KLIPPEL, J. H.; DIEPPE, P. A. (Ed). **Rheumatology**. London: Mosby, 1994, section 6, cap. 8.
- SEIBOLD, J. R. Current status of and future strategies for disease modification in systemic sclerosis. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 8, p. 553-554, 1996.
- SEIBOLD, J. R. Are we any closer to understanding scleroderma? **Curr. Opin. Rheum.**, v. 9, p. 537, 1997.
- SEIBOLD, J. R.; McCLOSKEY, D. A. Skin involvement as a relevant outcome measure in clinical trials of systemic sclerosis. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 9, p. 571-575, 1997.
- SIEGEL, S. **Estadística no paramétrica**. 2.ed. México: Trillas, 1975.
- SILMAN, A. J. Epidemiology of scleroderma. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 50, p. 846-853, 1991.

SILMAN, A. J.; NEWMAN, J. N. Epidemiology of systemic sclerosis. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 8, p. 585-589, 1996.

SILMAN, A. J.; HOCHBERG, M. C. Occupational and environmental influences on scleroderma. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v.4, p. 737-749, 1996.

SILMAN, A. J. Scleroderma – Demographics and survival. **J. Rheumatol.**, v. 24, p. 58-61, 1997.

SILVER, R. M.; MILLER, K. S. Lung involvement in systemic sclerosis. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 16, p. 199-216, 1990.

SILVER, R. M. Clinical aspects of systemic sclerosis (scleroderma). **Ann. Rheum. Dis.**, v. 50, p. 854-861, 1991.

SILVER, R. M. Clinical problems. The lung. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 22, p. 825-840, 1996.

SJOGREN, R. W. Gastrointestinal features of scleroderma. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 8, p. 569-575, 1996.

SPENCER-GREEN, G.; ALTER, D.; WELCH, H. G. Test performance in systemic sclerosis: anti-centromero and anti-Scl-70 antibodies. **Am. J. Med.**, v. 103, p. 242-248, 1997.

STAFFORD, L.; ENGLERT, H.; GOVER, J.; BERTOUCHE, J. Distribution of macrovascular disease in scleroderma. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 57, p. 476-479, 1998.

STEEN, V. D.; POWELL, D. L.; MEDSGER Jr., T. A. Clinical correlations and prognosis based on serum auto antibodies in patients with systemic sclerosis. **Arthritis Rheum.**, v. 31, p. 196-203, 1988.

STEEN, V. D. Systemic sclerosis. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 16, p. 641-654, 1990.

STEEN, V. D.; MEDSGER Jr., T. A. Epidemiology and natural history of systemic sclerosis. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 16, p. 1-10, 1990.

STEEN, V. D. Scleroderma renal crisis. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 22, p. 861-878, 1996.

STEEN, V. D. Occupational scleroderma. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 11, p. 490-494, 1999.

TAN, E. M.; CHRISTIA, C.; HOLMAN, H. R.; HOMMA, M.; KUNKEL, H. G.; REICHLIN, M.; SHARP, G. C.; ZIFF, M.; BARNETT, E. V. Anti-tissue antibodies in rheumatic disease standardization and nomenclature. **Arthritis Rheum.**, v. 20, p. 1419-1420, 1977.

TAN, E. M.; RODNAN, G.P.; GARCIA, I.; MOROI, Y.; FRIYSLER, M. J.; PEEBLES, C. Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. **Arthritis Rheum.**, v. 23, p. 617-625, 1980.

TAN, E. M. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for auto-immune diseases and probes for cell biology. **Adv. Immunol.**, v. 40, p. 93-151, 1989.

TERBORG, E. J.; PIERSMA-WICHERS, G.; ANDRIES, J. S.; KALLENBERG, C. G. M.; WOUDA, A. A. Serial nailfold capillary microscopy in primary Raynaud's phenomenon and scleroderma. **Semin. Arthr. Rheum.**, v. 24, p. 40-47, 1994.

TERSTAPPEN, L. W. M. M.; MICKAELS, R. A.; DOST, R.; LOKEN, M.R. Increased light scattering resolution facilitates multidimensional flow cytometric analysis. **Cytometry**, v. 11, p. 506-512, 1990.

TERSTAPPEN, L. W. M. M. Cell differentiation and maturation in normal bone marrow and acute leukaemia. In: MACEY, M. G. **Flow Cytometry – Clinical Applications**. Oxford: Blackwell, 1994, p. 101-115.

UMEHARA, H.; KUMAGAI, S.; ISHIDA, H.; SUGINOSHITA, T.; MAEDA, M.; IMURA, H. Enhanced production of interleukin-2 in patients with progressive systemic sclerosis. Hyperactivity of CD4-positive T cells? **Arthritis Rheum.**, v. 31, p. 401-407, 1988.

UNEMORI, E. N.; AMENTO, E. P. Connective tissue metabolism in scleroderma, including cytokines. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 8, p. 580-584, 1996.

VARGA, J.; KÄHÄRI, V. M. Eosinophilia-myalgia syndrome, eosinophilic fasciitis, and related fibrosing disorders. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 9, p. 562-570, 1997.

VEALE, D. J.; COLLIDGE, T. A.; BELCH, J. J. F. Increased prevalence of symptomatic macrovascular disease in systemic sclerosis. **J. Rheumatol.**, v. 54, p. 853-855, 1995.

WALPOLE, R. E.; MEYERS, R. H. **Probability and statistics for engineers and scientists**. 2.ed. London: Collier Macmillan, 1978.

WEINER, E. S.; EARNSHAW, W. C.; SENÉCAL, J. L.; BORDWELL, B.; JOHNSON, P.; ROTHFIELD, N. F. Clinical associations of anticentromere antibodies and antibodies to topoisomerase I. **Arthritis Rheum.**, v. 31, p. 378-385, 1988.

WHITE, B. Immunologic aspects of scleroderma. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 6, p. 612-615, 1994.

WHITE, B. Immunologic aspects of scleroderma. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 7, p. 541-545, 1995.

WHITE, B. Immunopathogenesis of systemic sclerosis. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 22, p. 695-708, 1996.

WHITESIDE, T. L.; KUMAGAI, Y.; ROUMM, A. D.; ALMENDINGER, R.; RODNAN, G. P. Suppressor cell function and T lymphocyte subpopulations in peripheral blood of patients with progressive systemic sclerosis. **Arthritis Rheum.**, v. 26, p. 841-847, 1983.

WIGLEY, F. M. Raynaud's phenomenon and other features of scleroderma, including pulmonary hypertension. **Curr. Opin. Rheum.**, v. 8, p. 501-568, 1996.

WIGLEY, F. M.; FLAVAHAN, N. A. Raynaud's phenomenon. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 22, p. 765-781, 1996.

WILSON, M. R.; SANDERS, R. D. Immunodiffusion assays for antibodies to small nuclear ribonucleoproteins and other cellular antigens. In: ROSE, N. R.; MACARIO, E. C.; FAHEY, J. L.; FRIEDMAN, H.; PENN, G. M. **Manual of Clinical Laboratory Immunology**. 4.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1992, p. 741-746.

WRIGHT, J. K.; HUGHES, P.; POWELL, N. R. Spontaneous lymphocyte-mediated (NK cell) cytotoxicity in systemic sclerosis: a comparison with antibody-dependent lymphocyte (K cell) cytotoxicity. **Ann. Rheum. Dis.**, v.41, p. 409-413, 1982.

YOUNG, M. A.; ROSE, S.; REYNOLDS, J. C. Gastrointestinal manifestations of scleroderma. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 22, p. 797-824, 1996.